

Die nichtadrenerge-nichtcholinerge Innervation  
der Thoraxorgane des Meerschweinchens

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Jan Oehler  
aus Heidelberg

Gießen 2002

Aus der Medizinischen Betriebseinheit Institut für Anatomie und Zellbiologie  
des Universitätsklinikums Gießen  
Leiter: Prof. Dr. W. Kummer

Gutachter: Prof. Dr. Kummer

Gutachter: Dr. Franke

Tag der Disputation: 8. Januar 2003

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die autonome efferente und sensible Innervation der Organe des Brustraumes	2
1.1.1	Die autonome efferente und sensible Innervation der Atemwege	3
1.1.2	Die autonome efferente und sensible Innervation des Herzens	5
1.1.3	Die autonome efferente und sensible Innervation der pulmonalen Gefäße	6
1.2	Mediatoren des autonomen Nervensystems	7
1.2.1	Niedermolekulare Transmittersubstanzen	9
1.2.2	Neuropeptide	12
1.2.3	Stickstoffmonoxid, NO	14
1.3	Die Physiologie der autonomen Innervation	15
1.3.1	Atemwege	15
1.3.2	Herz	16
1.3.3	Pulmonale Gefäße	18
1.4	Ziel dieser Untersuchung	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	Material	21
2.1.1	Antikörper	21
2.1.2	Reagenzien	22
2.1.3	Geräte	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Gewebeaufarbeitung	24
2.2.2	Immunfluoreszenz	24
2.2.3	Doppelimmunfluoreszenz	25
2.2.4	Fluoreszenzmikroskopie	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1	ChAT-, NOS-, NPY- und VIP-Immunreaktivität in Nervenzellkörpern und Nervenfasern der Brustraumorgane des Meerschweinchens	27
3.1.1	ChAT-Immunreaktivität	27
3.1.2	NOS-Immunreaktivität	28
3.1.3	NPY-Immunreaktivität	28
3.1.4	VIP-Immunreaktivität	29

3.2 Koexistenz von ChAT-, NOS-, NPY- und VIP-Immunreaktivität in Nervenzellkörpern und Nervenfasern	30
3.2.1 ChAT und NOS	30
3.2.2 ChAT und NPY	37
3.2.3 ChAT und VIP	42
3.2.4 NOS und NPY	46
3.2.5 NOS und VIP	53
3.2.6 NPY und VIP	58
<hr/>	
<b>4 Diskussion</b>	<b>62</b>
4.1 Methoden	62
4.2 Die autonome Innervation der Atemwege	63
4.2.1 Die Innervation der Atemwege durch ChAT-immunreaktive Nervenfasern	63
4.2.2 Die Innervation der Atemwege durch NOS-immunreaktive Nervenfasern	64
4.2.3 Die Innervation der Atemwege durch NPY-immunreaktive Nervenfasern	66
4.2.4 Die Innervation der Atemwege durch VIP-immunreaktive Nervenfasern	67
4.2.5 Zusammenfassende Darstellung der Systeme	68
4.3 Die autonome Innervation des Herzens	70
4.3.1 Die Innervation des Herzens durch ChAT-immunreaktive Nervenfasern	70
4.3.2 Die Innervation des Herzens durch NOS-immunreaktive Nervenfasern	70
4.3.3 Die Innervation des Herzens durch NPY-immunreaktive Nervenfasern	71
4.3.4 Die Innervation des Herzens durch VIP-immunreaktive Nervenfasern	72
4.3.5 Zusammenfassende Darstellung der Systeme	73
4.4 Die autonome Innervation der Pulmonalgefäße	74
4.4.1 Die Innervation der pulmonalen Gefäße durch ChAT-immunreaktive Nervenfasern	74
4.4.2 Die Innervation der pulmonalen Gefäße durch NOS-immunreaktive Nervenfasern	75
4.4.3 Die Innervation der pulmonalen Gefäße durch VIP-immunreaktive Nervenfasern	76
4.4.4 Die Innervation der pulmonalen Gefäße durch NPY-immunreaktive Nervenfasern	77
4.4.5 Zusammenfassende Darstellung der Systeme	78
<hr/>	
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>79</b>
<hr/>	
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>
<hr/>	



---

## **1 Einleitung**

Anfang des 20. Jahrhunderts unterteilte Langley das periphere autonome Nervensystem aufgrund anatomischer und funktioneller Kriterien in drei Anteile, den Sympathikus, den Parasympathikus und das enterale Nervensystem. Jahrzehnte später konnte Azetylcholin (ACh) als parasympathische Transmittersubstanz mit inhibitorischer Wirkung am Herzen (Loewi et Navratil 1926) und vasodilatatorischer Wirkung am Skelettmuskel (Uvnäs 1954) identifiziert werden. Der entgegengesetzte Effekt, nämlich die durch Stimulation sympathischer Nervenfasern hervorgerufene Vasokonstriktion, konnte auf die Ausschüttung von Noradrenalin (NA) zurückgeführt werden (von Euler 1946). Seit der Identifikation dieser beiden Neurotransmitter, die von den entsprechenden postganglionären Nervenendigungen des Sympathikus und des Parasympathikus ausgeschüttet werden, wurden die einzelnen Bereiche des peripheren autonomen Nervensystems auch als adrenerg und cholinerg bezeichnet. Durch die pharmakologische Blockade der cholinergen Neurotransmission konnte die durch parasympathische Nervenstimulation hervorgerufene Vasodilatation jedoch nur geringfügig vermindert werden (Bloom et Edwards 1980). Ebenso konnte die pharmakologische Blockade der adrenergen Neurotransmission eine durch sympathische Nervenstimulation hervorgerufene Vasokonstriktion nicht vollständig unterbinden (Folkow et Uvnäs 1948, Lundberg et Tatemoto 1982). Die Entdeckung bisher unbekannter vasoaktiver Substanzen in autonomen Nervenzellen legte die Existenz nichtadrenerger-nichtcholinерger Mechanismen der Blutflussregulation nahe. Im Rahmen weiterer Forschungsarbeiten konnte eine Vielzahl bisher unbekannter Transmittersubstanzen identifiziert werden (Said et Mutt 1970, Tatemoto et al. 1982, Burnstock et Kennedy 1986, Palmer et al. 1987), die von adrenergen und cholinergen Neuronen als sogenannte Kotransmitter zusätzlich zu den beiden Haupttransmittern ausgeschüttet werden. Erst jüngste Untersuchungen legen jedoch die Vermutung nahe, dass zusätzlich ein tatsächliches nichtadrenerges-nichtcholinerges System mit gesonderter anatomischer Lokalisation seiner Neurone existiert. Welche Bedeutung der nichtadrenergen-nichtcholinergen Innervation der Thoraxorgane des Meerschweinchens zukommt, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

### **1.1 Die autonome efferente und sensible Innervation der Organe des Brustraumes**

Das autonome Nervensystem hat die neuronale Kontrolle des inneren Milieus zur Aufgabe. Einer direkten willkürlichen Einflussnahme entzogen, reguliert es die Funktionen von Atemwegen, Herz und Gefäßen und passt sie den jeweiligen Bedürfnissen an. Das periphere vegetative Nervensystem besteht aus drei anatomisch und funktionell weitgehend getrennten Anteilen, die klassischerweise als Sympathikus, Parasympathikus und enterales Nervensystem bezeichnet werden. Die dazugehörigen zentralen vegetativen Zentren liegen im Fall des Sympathikus in der intermediären Zone des Brustmarks, im Fall des Parasympathikus und enteralen Nervensystems im Nucleus ambiguus und Nucleus dorsalis nervi vagi im Hirnstamm. Von diesen Zentren ziehen präganglionäre Fasern zur Peripherie, wo sie in Ganglien auf postganglionäre Neurone umgeschaltet werden (Wang et al. 2001).

Die sympathischen präganglionären Fasern verlassen das Rückenmark über die Vorderwurzeln und die Rami communicantes albi und ziehen zu den paravertebralen Grenzstrangganglien. Dort erfolgt die Signalübertragung auf postganglionäre Neurone, die über die Rami communicantes grisei zu den Effektoren in die Peripherie projizieren (Jackson et Cunnane 2001).

Die präganglionären parasympathischen Fasern verlassen den Hirnstamm im Nervus vagus und ziehen mit ihm zu den Organen im Brustraum. Hier enden sie an lokalen Ganglien in der Nähe oder innerhalb der Erfolgsorgane und werden auf postganglionäre Neurone umgeschaltet (Hollenberg 1986).

Die vegetativen postganglionären Nervenfasern sind entlang ihrer Endaufzweigungen mehrfach perlschnurartig aufgetrieben. Diese Varikositäten stellen den Kontakt zum Erfolgsorgan her und dienen der Speicherung verschiedener Neurotransmitter. Als klassischer Überträgerstoff an allen präganglionären vegetativen und postganglionären parasympathischen Nervenfasern gilt das ACh (Loewi et Navratil 1926, Uvnäs 1954). NA gilt als der Neurotransmitter an den meisten postganglionären sympathischen Nervenfasern (von Euler 1946, 1948, Folkow et Uvnäs 1948, Peart 1949). NA und ACh sind jedoch nicht die einzigen Überträgersubstanzen im peripheren vegetativen Nervensystem. Aus experimentellen Untersuchungen geht hervor, dass in vielen Organen nach Reizung vegetativer Nerven Effekte auslösbar sind, die nicht durch Blockade der adrenergen und cholinergen Übertragung beseitigt werden können. Stickstoffmonoxid (NO) (Palmer et al.

1987, Ignarro et al. 1987), Neuropeptid Y (NPY) (Tatemoto 1982, Lundberg et Tatemoto 1982) und Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) (Said et Mutt 1970, Bloom et Edwards 1980, Lundberg 1980, Uddman et al. 1980) werden neben vielen anderen Überträgerstoffen für solche Effekte verantwortlich gemacht.

Die Organe des Brustraumes werden außer durch vegetative Efferenzen auch durch zahlreiche sensible Fasern innerviert. Diese viszerale Afferenzen sind in die neuronale Regulation von Herz, Lunge und Kreislaufsystem eingebunden und melden neben Schmerzreizen die Reizung der Mechano- und Chemorezeptoren (Kummer 1988, Kummer et al. 1989). Ihre Zellkörper liegen im Ganglion nodosum und Ganglion jugulare des Nervus vagus und in den Spinalganglien (Kummer et al. 1992). Die Signalübertragung an der zentralen Synapse erfolgt zumeist durch Glutamat. Zusätzlich sind in einer Population sensibler Neurone verschiedene Mediatoren aber auch in der peripheren Endigung zu finden und werden dort als Antwort auf lokale Reize auch freigesetzt (lokale Effektorfunktion sensibler Fasern). Klassische Mediatoren an der peripheren Endigung sensibler Neurone sind z.B. die Tachykinine, aber auch weitere Neuropeptide und NO konnten bereits in diesen Nervenzellen nachgewiesen werden (Kummer 1988, Kummer et al. 1992, Fischer et al. 1996).

#### 1.1.1 Die autonome efferente und sensible Innervation der Atemwege

Die sympathische und sensible Innervation der Atemwege des Meerschweinchens konnte durch retrograde neuronale Tracingexperimente differenziert dargestellt werden (Kummer et al. 1992, Bowden et Gibbins 1992, Fischer et al. 1996).

Sympathische Ursprungsneurone, die mit ihren Fasern die Trachea innervieren, ließen sich im Ganglion cervicale superius und im Ganglion stellatum nachweisen. Die Lunge erhält ihre sympathische Innervation aus dem Ganglion stellatum und den thorakalen Grenzstrangganglien T2-T4. In den meisten markierten Nervenzellen ließen sich Tyrosinhydroxylase (TH), das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Katecholaminsynthese, und NPY nachweisen (Kummer et al. 1992). In einem geringen Anteil der getrackten Nervenzellen war keine TH, dafür aber NPY (Kummer et al. 1992),

NPY und VIP (Bowden et Gibbins 1992) oder NO-Synthase (NOS) (Fischer et al. 1996) darzustellen.

Im Bereich der extrapulmonalen Atemwege erhalten vor allem die gefäßreiche Adventitia sowie die Muskelschicht und die Lamina submucosa noradrenerge, NPY-immunreaktive Fasern. Intrapulmonal ist bevorzugt die Muscularis, aber auch die Submucosa bis zu den terminalen Bronchioli NPY/noradrenerg innerviert.

Nichtadrenerge, NPY- und VIP-immunreaktive, sowie nur VIP-immunreaktive Fasern innervieren vor allem die Muscularis der Trachea und der Bronchi, letztere auch die Lamina submucosa der extrapulmonalen Atemwege (Uddman et al. 1978, Lundberg et al. 1984, Kummer et al. 1992, Fischer et al. 1996).

Eine ähnliche Verteilung haben auch die Fasern mit NOS-Immunreaktivität. Am häufigsten sind sie in der glatten Muskulatur und der Lamina submucosa der Hauptbronchi zu finden. Nach proximal zur zervikalen Trachea und nach distal zur Lungenperipherie hin nimmt ihre Dichte ab (Fischer et al. 1993, 1996).

Die parasympathische Innervation findet über lokale Atemwegsganglien entlang des Tracheobronchialstamms statt, die ihrerseits präganglionäre parasympathische Fasern aus dem Nucleus ambiguus erhalten. Sämtliche intrinsischen Atemwegsneurone zeigen Immunreaktivität für Cholinazetyltransferase (ChAT), das ACh synthetisierende Enzym. Cholinerge Fasern finden sich vor allem im Bereich der Atemwegsmuskulatur von der Trachea bis zu den Bronchioli terminales und in der Submukosa von Trachea und Bronchien (Fischer et al. 1996, Canning et Fischer 1997).

Ein weiterer Innervationsweg ergänzt die autonome Innervation. Ebenfalls durch neuronale Tracingexperimente konnten Neurone dargestellt werden, deren Zellkörper im Ösophagus liegen und von dort die Trachealmuskulatur innervieren. Sie benutzen NO, VIP und NPY zur Signalübertragung (Fischer et al. 1998, Moffatt et al. 1998) und sind damit mögliche Ursprungsneurone bekannter NOS- und VIP-immunreaktiver Fasern (Kummer et al. 1992). Sensible Neurone, deren Fasern die Atemwege und die Lunge innervieren, konnten im Ganglion jugulare und im Ganglion nodosum sowie in thorakalen Spinalganglien dargestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist von besonderem Interesse, dass 5-10% der retrograd markierten Ganglion nodosum-Neurone und 10-20% der getrackten Ganglion jugulare-

Neurone Immunreaktivität für NOS zeigten. Sie kommen somit als Ursprung eines Teils der oben beschriebenen NOS-immunreaktiven Fasern in Frage (Fischer et al. 1996).

#### 1.1.2 Die autonome efferente und sensible Innervation des Herzens

Die sympathische Innervation des Herzens hat ihren Ursprung in den ersten vier Grenzstrangganglien und im Ganglion stellatum. Postganglionäre Fasern dieser Neurone innervieren im Herzen den Sinus- und AV-Knoten, das Myokard, lokale Neurone und die Herzkranzgefäße (Dalsgaard et al. 1986, Steele et Choate 1994, Kennedy et al. 1998). Typische Überträgerstoffe postganglionärer sympathischer Fasern sind NA und NPY. Sowohl im Vorhof als auch im Ventrikel kann ein dichtes Netzwerk NPY- und TH-immunreaktiver Fasern mit zum Teil überlappendem Verteilungsmuster beobachtet werden (Dalsgaard et al. 1986, Steele et Choate 1994). NPY-immunreaktive Fasern innervieren außer der Herzmuskulatur auch Koronargefäße und intrinsische kardiale Neurone (Uddmann et al. 1985, Kennedy et al. 1998).

Auf parasympathischer Seite entstammen die präganglionären Fasern dem Nucleus ambiguus. Intrinsische Neurone, die den Ursprung der postganglionären parasympathischen Fasern darstellen, sind beim Meerschweinchen in zwei Regionen lokalisiert. Die eine ist der dorsale Bereich des Vorhofseptums an der Mündung der Pulmonalvenen, die andere liegt subepikardial am rechten Vorhof zwischen den Mündungen der Venae cavae (Steele et Choate 1994). Sie zeigen alle ChAT-Immunreaktivität (Mawe et al. 1996) und in einigen Fällen zusätzlich NPY-Immunreaktivität (Dalsgaard et al. 1986, Kennedy et al. 1998). In etwa 5% der kardialen Neurone ist außerdem NOS nachzuweisen (Hassall et al. 1992, Klimaschewski et al. 1992, Tanaka et al. 1993, Sosunov et al. 1996). VIP-immunreaktive Nervenzellkörper konnten in intrinsischen kardialen Ganglien des Meerschweinchens nicht dargestellt werden (Della et al. 1983).

Cholinerge Fasern innervieren im Herzen das Reizleitungssystem, das Arbeitsmyokard, lokale Neurone und die Koronargefäße (Mawe et al. 1996).

NOS ist in Fasern, die den Sinus- und AV-Knoten, das Myokard, lokale Neurone und die Koronargefäße versorgen, nachzuweisen (Klimaschewski et al. 1992, Tanaka et al. 1993, Tanaka et Chiba 1995, Sosunov et al. 1995, 1996).

VIP-immunreaktive Fasern spielen in der kardialen Innervation zahlenmäßig eine untergeordnete Rolle (Della et al. 1983). Sie sind vor allem im Reizleitungssystem (Weihe et Reinecke 1981, Steele et Choate 1994) und im Vorhof lokalisiert. Sie kommen hier in kardialen Ganglien, im Endokard und im Epikard vor und innervieren außerdem die Koronargefäße (Weihe et al. 1984).

### 1.1.3 Die autonome efferente und sensible Innervation der pulmonalen Gefäße

Sympathische Fasern, die die pulmonalen Gefäße versorgen, entstammen Zellkörpern der zervikalen und ersten fünf thorakalen Grenzstrangganglien (Daly et Hebb 1966, Richardson 1979). TH- und NPY-immunreaktive Fasern (Uddman et al. 1984, Kummer et al. 1992), größtenteils sympathischen, postganglionären Ursprungs, können beim Meerschweinchen in arteriellen und venösen Gefäßen mit einem Durchmesser bis zu 50 µm nachgewiesen werden (Haberberger et al. 1997).

NOS-immunreaktive Nervenfasern sind dagegen nur an Arterien mit über 350 µm und an Venen mit über 700 µm Durchmesser mit über 50%iger Regelmäßigkeit darstellbar (Haberberger et al. 1997).

Nichtadrenerge, NPY/VIP-, bzw. nur VIP-immunreaktive Fasern sind an der Innervation des pulmonalen Gefäßbettes beteiligt (Kummer et al. 1992). Autoradiographisch konnte im Bereich der glatten Pulmonalgefäßmuskulatur eine hohe VIP-Rezeptorendichte gezeigt werden (Carstairs et Barnes 1986).

Die cholinerge Innervation der Pulmonalgefäße des Meerschweinchens wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Während manche Autoren nur im extrapulmonalen Gefäßbett Azetylcholinesterase-positive Fasern zeigen konnten (Cech 1973), beschreibt eine immunhistologische Studie ChAT-immunreaktive Fasern in Arterien und Venen bis zu einem Durchmesser von 50 µm (Haberberger et al. 1997). Als Ursprung der präganglionären parasympathischen Fasern gilt entsprechend der Atemwegsinnervation der Nucleus ambiguus (Daly et Hebb 1966), während der Sitz der intrinsischen Ganglienzellen nach wie vor unklar ist.

## **1.2 Mediatoren des autonomen Nervensystems**

Die Signalübertragung zwischen Nervenzellen beziehungsweise zwischen Nervenzelle und Effektororgan an chemischen Synapsen lässt sich schematisch in mehrere Schritte gliedern. Im allgemeinen setzt sie die Synthese einer Transmittersubstanz im präganglionären Neuron und ihre Speicherung in dessen präsynaptischer Endigung voraus. Auf einen entsprechenden Reiz hin wird diese Transmittersubstanz in genügend großer Menge freigesetzt, um am postsynaptischen Neuron oder Effektororgan eine bestimmte Wirkung hervorzurufen. Hierzu wird die Transmittersubstanz von spezifischen Rezeptoren gebunden, welche ihrerseits entweder durch direkte Aktivierung von Ionenkanälen oder durch sogenannte Second Messenger-Systeme den biochemischen Zustand der postsynaptischen Zelle verändern. Das autonome Nervensystem benutzt drei unterschiedliche Klassen von chemischen Substanzen zur Signalübertragung – niedermolekulare Transmitter, neuroaktive Peptide und Gase. Zwischen den drei Klassen bestehen grundlegende zellbiologische Unterschiede (Holmgren et Jensen 2001). Zu den Neurotransmittern mit niedrigem Molekulargewicht zählen ACh, biogene Amine (Dopamin, NA, Adrenalin, Serotonin und Histamin), Aminosäuren (Gamma-Aminobuttersäure, Glycin und Glutamat) sowie ATP und seine Abbauprodukte. Sie alle sind kleine Moleküle mit kurzen Biosynthesewegen, die durch Enzyme in der Nervenendigung synthetisiert werden. Diese Enzyme werden ihrerseits an freien Polysomen oder am rauen endoplasmatischen Retikulum des Zellkörpers synthetisiert, um von dort durch langsamen beziehungsweise schnellen vesikulären axonalen Transport im gesamten Neuron verteilt zu werden. Niedermolekulare Transmittersubstanzen können daher in allen Teilen der Nervenzelle synthetisiert werden, insbesondere auch in den präsynaptischen Nervenendigungen, aus denen sie freigesetzt werden. Substrate für ihre Synthese sind ubiquitär vorkommende organische Verbindungen, die dem normalen Zellstoffwechsel entstammen. Die Ausschüttung der niedermolekularen Transmitter kann daher rasch und anhaltend erfolgen, da entleerte Speichervesikel sehr schnell wieder mit Transmittermolekülen aufgefüllt werden können (Holmgren et Jensen 2001).

Im Gegensatz zu den niedermolekularen Transmittersubstanzen stammen die neuroaktiven Peptide von Proteinen ab, die nur im Zellkörper an Ribosomen gebildet werden können. Wie alle sekretorischen Proteine werden diese meist 10-30 Aminosäuren umfassenden Polypeptide zunächst am rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und dann im

Golgi-Apparat weiter verändert. Den Golgi-Apparat verlassen die Peptide in sekretorischen Granula, die durch schnellen axonalen Transport in die präsynaptischen Nervenendigungen transportiert werden. Die synaptische Freisetzung neuroaktiver Peptidbotenstoffe unterscheidet sich insofern stark von der oben charakterisierten Freisetzung niedermolekularer Transmitter, da Peptide erst vom Zellkörper nachgeliefert werden müssen, bevor eine erneute Freisetzung stattfinden kann (Holmgren et Jensen 2001).

Eine Sonderstellung nimmt das als Transmittersubstanz wirkende Gas NO ein. Im Gegensatz zu niedermolekularen Transmittern und den neuroaktiven Transmittern kann NO nicht in den terminalen Nervenendigungen gespeichert werden, sondern wird im Bedarfsfall durch das Enzym NO-Synthase synthetisiert und kann daraufhin frei in sämtliche angrenzenden Zellen diffundieren (Bredt et Snyder 1992).

Zuletzt ist auch die rechtzeitige Entfernung der Transmittersubstanz aus dem synaptischen Spalt für eine effektive Signalübertragung von entscheidender Bedeutung. Blicke die Transmittersubstanz nach ihrer Freisetzung chemisch unverändert im Spalt, so würde sie die Übertragung neuer Signale auf die postsynaptische Zelle verhindern. Durch die ununterbrochene Exposition des postsynaptischen Rezeptors gegenüber dem Transmitter würde die Synapse ihre Funktion verlieren. Im Nervengewebe gibt es daher mehrere Mechanismen, durch die nichtgebundene Transmittermoleküle aus dem synaptischen Spalt entfernt werden können. Ein Mechanismus, der einen Teil aller chemischer Botenstoffe eliminiert, ist die Diffusion. Der enzymatische Abbau von Transmittersubstanzen ist ebenfalls ein verbreiteter Mechanismus der Inaktivierung. Bekanntestes Beispiel hierfür ist die enzymatische Spaltung des ACh in Cholin und Azetat durch die Azetylcholinesterase. Dieses in der Membran verankerte extrazelluläre Enzym hydrolysiert jedes vom Rezeptor abdissoziierte ACh-Molekül, so dass dieses nur ein einziges Mal Verwendung findet und die synaptische Botschaft schnell beendet ist (Leonard et Bertrand 2001). Die Wiederaufnahme von Transmittersubstanzen ist ein weiterer wichtiger Mechanismus, um den synaptischen Spalt von chemischen Botenstoffen zu befreien. Hochaffine Transportmoleküle, die in der Membran von Nervenzellen sitzen, vermitteln diesen sogenannten Reuptake in die präsynaptische Endigung. Da es unterschiedliche Transportmoleküle gibt, haben die einzelnen Neuronentypen jeweils ihren eigenen charakteristischen Aufnahmemechanismus. Neuroaktive Peptide werden aus dem synaptischen Spalt langsamer entfernt als die niedermolekularen Transmitter. Vermutlich sind Diffusion und enzymatischer Abbau durch



extrazelluläre Peptidasen die einzigen Eliminationsmechanismen für diese Transmittersubstanzen. Die langsame Entfernung aus dem synaptischen Spalt trägt zu der langanhaltenden Wirkung der neuroaktiven Peptide bei (Holmgren et Jensen 2001).

### 1.2.1 Niedermolekulare Transmittersubstanzen

#### **Azetylcholin (ACh)**

ACh gilt als Überträgerstoff an allen präganglionären vegetativen Nervenendigungen, an allen parasympathischen und einigen sympathischen postganglionären Nervenendigungen. ACh ist außerdem für die Signalübertragung an der motorischen Endplatte und an etlichen Synapsen des ZNS verantwortlich (Lindstrom 1996, Gotti et al. 1997).

Die Synthese des ACh erfolgt im Zytoplasma der Nervenzelle aus Cholin und Azetyl-Coenzym A. Mit Hilfe des Enzyms Cholinazetyltransferase wird die Azetylgruppe des Azetyl-Coenzym A auf Cholin übertragen. Azetyl-Coenzym A wird innerhalb der Mitochondrien gebildet, während Cholin aktiv aus dem Extrazellularraum aufgenommen werden muss. Die Cholinazetyltransferase wird im Zellkörper der Nervenzelle synthetisiert und axoplasmatisch zu den Nervenendigungen transportiert. In den Nervenendigungen wird ACh nach seiner Synthese in Vesikeln gespeichert, die bei Eintreffen eines Aktionspotentials in den synaptischen Spalt entleert werden (Lindstrom 1996). Die Wirkung von ACh auf die postsynaptische Membran der postganglionären Neuronen lässt sich durch Nikotin simulieren, die hier vorherrschenden Rezeptoren werden daher als nikotinerg bezeichnet. Nikotinerge Rezeptoren sind in die postsynaptische Membran eingebaute Proteine, die Ionenkanäle bilden. ACh bewirkt am nikotinergen Rezeptor eine allosterische Formveränderung, die durch Aufweitung eines zentralen Kanals zur Durchgängigkeit für Natrium- und Kalium-Kationen führt (Gotti et al. 1997). Die Wirkung von ACh auf die Effektorzellen wird durch Muskarin, ein Gift des Fliegenpilzes, simuliert, weshalb man die hier vorherrschenden Rezeptoren als muskarinerg bezeichnet. Sobald sich ACh an den muskarinergen Rezeptor angelagert hat, ändert sich dessen Konformation und an einer intrazellulären Rezeptordomäne kann ein Guanosindiphosphat (GDP)-tragendes G-Protein binden. Das an das G-Protein gebundene GDP wird daraufhin gegen Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht, und das aktivierte G-Protein, eine an GTP gekoppelte Untereinheit des

G-Proteins, greift schließlich am gewünschten Effektor an. So kann z.B. die Phospholipase C aktiviert werden, die ihrerseits das Diacylglycerin-Inositoltriphosphatsystem in Gang setzt oder über andere, teilweise noch nicht identifizierte Second Messenger-Systeme bestimmte Ionenkanäle beeinflusst werden. (Hollenberg 1986).

Die Beendigung der ACh-Wirkung erfolgt in erster Linie durch dessen enzymatische Spaltung. Jedes vom Rezeptor abdissoziierte Transmittermolekül wird von der membranständigen, extrazellulären Azetylcholinesterase in Cholin und Azetat zersetzt. Das in der Hydrolyse entstehende Cholin wird dann durch einen hochaffinen Transportmechanismus wieder in die cholinerge Nervenendigung aufgenommen.

### **Noradrenalin (NA)**

NA ist der klassische Überträgerstoff an den meisten postganglionären sympathischen Nervenendigungen. In varikösen Auftreibungen entlang ihrer Endverzweigungen wird NA synthetisiert und gespeichert. Die Ausgangssubstanz der NA-Synthese, die Aminosäure L-Tyrosin, wird von der Nervenzelle aktiv aus dem Extrazellularraum aufgenommen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der NA-Synthese ist die Umwandlung von L-Tyrosin zu L-Dopa durch die Tyrosinhydroxylase (TH). Durch die DOPA-Decarboxylase wird L-Dopa dann zu Dopamin decarboxyliert und dieses durch die Dopamin-beta-Hydroxylase zu NA hydroxyliert. Wie alle Enzyme werden auch die TH, die DOPA-Decarboxylase und die Dopamin-beta-Hydroxylase im Körper der Nervenzelle synthetisiert und in die Nervenendigungen transportiert. Die Speicherung von NA findet sowohl in kleinen als auch in großen Vesikeln statt (Fried et al. 1985).

Für NA sind verschiedene Alpha- und Beta-Adrenorezeptoren bekannt. Sie alle sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben membrandurchspannenden Domänen, die strukturell dem oben genannten muskarinergen ACh-Rezeptor ähneln (Kaumann 1991).

Alpha-1-Rezeptoren befinden sich auf den postsynaptischen Zellen der peripheren Zielorgane (Schulze et Fu 1996). Ihre Aktivierung führt in erster Linie zu einer Tonuserhöhung der glatten Muskulatur. Ihre Wirkung vermitteln sie durch die Aktivierung der Phospholipase C und des nachfolgenden Diacylglycerin-Inositoltriphosphatsystems. Inositoltriphosphat erhöht seinerseits die Konzentration freier Kalziumionen, indem es deren Freisetzung aus intrazellulären membranösen Speichern anregt.

Alpha-2-Rezeptoren vermitteln ihre Wirkung einerseits durch die Hemmung der Adenylatzyklase und senken so die Konzentration des sekundären Botenstoffs cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), andererseits sind sie über G-Proteine direkt an Ionenkanäle gekoppelt. Als präsynaptische Autorezeptoren auf den terminalen Nervenendigungen vegetativer Neurone regulieren sie deren Neurotransmitter-Ausschüttung (Langer 1981, Lundberg et al. 1984, 1986, Dahlof et al. 1986, Starke 1987). Betarezeptoren vermitteln ihre Wirkung im Wesentlichen durch Aktivierung der Adenylatzyklase, erhöhen also die Konzentration des sekundären Botenstoffs cAMP. Beta-1-Rezeptoren kommen im wesentlichen im Herzen vor (Molenaar et al. 1987) und vermitteln dort die Zunahme der Herzfrequenz und der Kontraktionskraft (Dahlof et al. 1991), außerdem vermitteln sie die Freisetzung von Renin und von freien Fettsäuren im Rahmen der Lipolyse. Beta-2-Rezeptoren vermitteln im wesentlichen die Dilatation von Bronchien und Arterien (Bao et al. 1990).

Die Beendigung der NA-Wirkung erfolgt durch Abdiffusion aus dem synaptischen Spalt, durch extraneurale NA-Aufnahme und vor allem durch aktive Wiederaufnahme in die präsynaptische Nervenendigung. Dort kann NA erneut in Vesikeln gespeichert werden oder durch die Enzyme Monoaminoxidase und Catechol-o-Methyltransferase abgebaut werden.

### **Adenosintriphosphat (ATP)**

ATP, ein Mononucleotid aus Adenin, Ribose und drei Phosphorsäureresten, ist der wichtigste Energiespeicher und –überträger des Intermediärstoffwechsels und ein gruppenübertragendes Koenzym. In manchen Synapsen wirken ATP und seine Abbauprodukte als Transmittersubstanzen.

ATP wurde in Speichervesikeln sympathischer Nervenendigungen nachgewiesen und kann durch sympathische Nervenstimulation ausgeschüttet werden. ATP führt an arteriellen Gefäßen zu einer schnellen, kurz dauernden Vasokonstriktion (Burnstock et Kennedy 1986, Burnstock 1988, 1990), die sich durch die Blockade der purinergen Rezeptoren auf den glatten Gefäßmuskelzellen unterdrücken lässt (Muramatsu 1987, Warland et Burnstock 1987, Bao et al. 1990).

### 1.2.2 Neuropeptide

#### **Vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP)**

VIP ist ein aus 28 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, das erstmals aus dem Duodenum des Schweins isoliert wurde (Said et Mutt 1970, Mutt et Said 1974). Es ist mit den Peptiden der Sekretin-Glucagon-Familie strukturell verwandt und hat ausgeprägte vasodilatorische Eigenschaften (Bloom et Edwards 1980). Da es in parasympathischen Nervenendigungen exokriner Drüsen nachgewiesen werden konnte (Lundberg 1980, Uddman et al. 1980), wurde es rasch als nichtcholinerge parasympathische Transmittersubstanz betrachtet. Man vermutete, dass VIP als Kotransmitter des AChs unter anderem für die parasympathische Regulation der Nasenschleimhaut und der Speicheldrüsen verantwortlich sei (Lundberg 1981). In zahlreichen Geweben konnte VIP jedoch auch kolokalisiert mit NPY und NO in postganglionären autonomen Fasern nachgewiesen werden (Uddman et Sundler 1986, Leblanc et al. 1987, Sheikh et al. 1988, Lacroix et al. 1990).

VIP wird wie viele andere Polypeptide in großen Vesikeln in den terminalen Nervenendigungen gespeichert (Johansson et Lundberg 1981, Laitinen et al. 1985). VIP führt nach Bindung an den VIP-Rezeptor zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase. Über den Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt es eine Relaxation der glatten Muskulatur und so die erwähnte Vasodilatation (Taton et al. 1982, Lundberg et Tatemoto 1982, Itoh et al. 1985, Schoeffter et Stoclet 1985).

#### **Neuropeptid Y (NPY)**

NPY ist ein aus 36 Aminosäuren bestehendes, Tyrosin-haltiges Polypeptid, das erstmals aus dem Gehirn von Schweinen isoliert wurde (Tatemoto 1982, Tatemoto et al. 1982). Wie alle Neuropeptide wird es im Zellkörper der Nervenzelle synthetisiert, gelangt per axonalem Transport in deren terminale Nervenendigungen und wird dort in großen Vesikeln gespeichert (Pelletier et al. 1984, Fried et al. 1985).

In zahlreichen postganglionären Sympathikusneuronen wird NPY neben NA als Kotransmitter gebildet (Lundberg et Tatemoto 1982, Lundberg et al. 1983, Ekblad et al. 1984). NPY-immunreaktive Nervenfasern konnten sowohl perivaskulär in vielen verschiedenen Gefäßterritorien als auch in der Nähe von nicht-vaskulären Muskelzellen des

Herzens und zahlreicher anderer Organe dargestellt werden (Lundberg et Tatemoto 1982, Lundberg et al. 1983, 1984, Gu et al. 1983, Edvinsson et al. 1983, Ekblad et al. 1984).

NPY bewirkt an arteriellen Gefäßen eine subakut einsetzende, jedoch starke und langanhaltende Vasokonstriktion (Lundberg et Tatemoto 1982). Diese konstriktorische Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen wird vor allem durch die Aktivierung des NPY1-Rezeptors verursacht (Grundemar et al. 1992, Wahlestedt et al. 1986). Dieser G-Protein gekoppelte Rezeptor vermittelt einerseits einen Anstieg der intrazellulären Kalziumionen-Konzentration durch deren Freisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern, andererseits eine Inhibition der Adenylatzyklase und damit einen Abfall der intrazellulären cAMP-Konzentration (Aakerlund et al. 1990, Herzog et al. 1992).

Über präsynaptische NPY2-Rezeptoren auf postsynaptischen sympathischen Nervenendigungen reguliert NPY außer seiner eigenen Ausschüttung (Pernow et Lundberg 1989) die von NA (Lundberg et Stjärne 1984, Pernow et al. 1986) und ATP (Stjärne et al. 1986). Zusätzlich scheint NPY die Transmitterausschüttung aus parasympathischen Nervenendigungen im Herzen (Potter 1987), in der Trachea (Grundemar et al. 1988, Matran et al. 1989) und aus sensiblen Nervenendigungen in den Atemwege zu regulieren (Matran et al. 1989).

NPY nimmt so zum einen direkten Einfluss auf den Tonus der glatten Muskulatur, zum anderen reguliert es über Rezeptoren auf prä- und postganglionären Fasern die Ausschüttung anderer Neurotransmitter.

### 1.2.3 Stickstoffmonoxid, NO

Lange bevor NO als Transmittersubstanz entdeckt wurde, wusste man von der therapeutischen Wirkung von Nitro-Vasodilatoren wie Nitroglycerin bei ischämischen Herzerkrankungen und hypertensiven Entgleisungen. Die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur durch ACh, die nur bei intaktem Gefäßendothel eintritt, wurde auf einen sogenannten endothelium-derived relaxing factor zurückgeführt (Furchgott et Zawadzki 1980), den man Jahre später als NO identifizieren konnte (Palmer et al. 1987, Ignarro et al. 1987).

Seine Synthese wird durch ein spezifisches Enzym, die NO-Synthase (NOS) katalysiert (Mayer et al. 1989). Mit NADPH als Kofaktor setzt die NOS L-Arginin über Argininhydroxid zu Citrullin und Stickstoffmonoxid um (Palmer et Moncada 1989). NOS wird via des Proteins Calmodulin durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumionen-Konzentration aktiviert (Bredt et Snyder 1990, Busse et Mülsch 1990). Die NOS existiert in einer konstitutiven und einer induzierbaren Form. Zweitere lässt sich unter anderem in Makrophagen nachweisen und ist für deren bakterizide Wirkung mitverantwortlich (Nathan et Hibbs 1991). Erstere lässt sich wiederum in Subtypen unterteilen, von denen die neuronale und die endotheliale NOS zwei verschiedene Enzymisoformen darstellen (Mayer et al. 1989, Busse et Mülsch 1990, Bredt et Snyder 1990, Bredt et al. 1992). Der Nachweis der NOS in Neuronen des zentralen (Bredt et al. 1990) und des peripheren (Ceccatelli et al. 1992, Kummer et al. 1992) Nervensystems legte die Vermutung nahe, dass NO als neuronale Transmittersubstanz wirkt. Im Gegensatz zu den klassischen niedermolekularen Transmittern und den Neuropeptiden wird NO jedoch nicht in Vesikeln gespeichert, sondern wird im Bedarfsfall als direkte Folge einer Depolarisation synthetisiert und freigesetzt (Bredt et Snyder 1992).

Die Relaxation der glatten Muskulatur durch NO ist Folge einer Interaktion des NO mit der Guanylatzyklase. NO bewirkt über eine Aktivierung dieses Enzyms einen intrazellulären cGMP-Anstieg (Waldman et Murad 1987, Bush et al. 1992, Knispel et al. 1992, Rajfer et al. 1992). Durch cGMP werden wiederum spezifische Proteinkinasen aktiviert, die unter anderem in der Lage sind, den Tonus der glatten Muskulatur zu vermindern (Waldman et Murad 1988, Lindgren et al. 1991).

### **1.3 Die Physiologie der autonomen Innervation**

#### **1.3.1 Atemwege**

Die Stimulation des postganglionären sympathischen Nervenstamms führt zu einer Relaxation der Atemwegsmuskulatur. Dieser Effekt wird direkt über adrenerge Beta-2-Rezeptoren vermittelt. Indirekt reduziert NA den bronchokonstriktorischen Effekt cholinerger Bronchokonstriktion über präsynaptische inhibitorische Alpha-2-Rezeptoren (Andersson et Grundstrom 1987).

ACh aus postganglionären parasympathischen Fasern führt zu einer Bronchokonstriktion. Diese kommt durch eine direkte konstriktorische Wirkung an muskulären M3-Rezeptoren (Minette et Barnes 1990, Morrison et Vanhoutte 1992, Preuss et Goldie 1999) sowie durch indirekte, M2- und M3-Rezeptor-vermittelte, inhibitorische Wirkung an sympathischen Nervenendigungen zustande (Pendry et MacLagan 1991, Racke et al. 1992).

Die cholinerge Neurotransmission wird in parasympathischen Atemwegsganglien des Meerschweinchens durch die Stimulation muskarinerger M1-Rezeptoren verstärkt (Yang et Biggs 1991), während sie an postganglionären cholinergen Nervenendigungen beim Menschen durch inhibitorische M2-, beim Meerschweinchen durch inhibitorische M1-, M2- und M4-Rezeptoren inhibiert wird (Minette et Barnes 1990, Doelman et al. 1991, Yang et Biggs 1991, Kilbinger et al. 1995, Patel et al. 1995).

VIP führt über die Bindung an epithelialen und glattmuskulären VIP-Rezeptoren (Carstairs et Barnes 1986) zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und damit beim Menschen, beim Meerschweinchen und bei vielen anderen Spezies zur Tracheo- und Bronchodilatation (Hand et al. 1984, Lundberg et al. 1984, Saga et Said 1984, Palmer et al. 1986). In niedrigerer Konzentration scheint VIP über inhibitorische präsynaptische Rezeptoren die cholinerge und nichtcholinerge Transmitterausschüttung aus postganglionären parasympathischen Nervenendigungen zu regulieren (Venugopalan et al. 1984, Belvisi et al. 1993, Shigyo et al. 1997).

NO hat über einen cGMP-Anstieg (Hwang et al. 1998) eine Relaxation der Atemwegsmuskulatur zur Folge (Lei et al. 1993, Venugopalan et al. 1998). NO inhibiert außerdem die ACh-Freisetzung aus postganglionären cholinergen Nervenendigungen (Belvisi et al. 1991, 1993).

NPY führt in vitro zu keiner (Grundemar et al. 1988) bzw. zu einer allenfalls leichten Kontraktion der Atemwegsmuskulatur des Meerschweinchens. Dieser Effekt lässt sich durch Indomethacin blockieren und scheint demnach durch eine sekundäre Prostaglandinsynthese bedingt zu sein (Cadieux et al. 1989, Taoudi Benchekroun et al. 1992). Zusätzlich zu seiner kontraktilen Wirkung inhibiert NPY die bronchodilatatorische Wirkung von NA und VIP (Taoudi Benchekroun et al. 1992, 1993). Neben diesen direkten Effekten ist NPY außerdem in der Lage, über Rezeptoren auf terminalen Nervenendigungen sowohl die cholinerge und noradrenerge als auch die bronchokonstriktorische, nichtadrenerge-nichtcholinerge Neurotransmission zu inhibieren (Grundemar et al. 1988, Stretton et Barnes 1988, Stretton et al. 1990, Taoudi Benchekroun et al. 1992).

### 1.3.2 Herz

Die Stimulation des Sympathikus hat am Herzen einen positiv bathmotropen, chronotropen, dromotropen und inotropen Effekt. Mit anderen Worten ausgedrückt führt eine sympathische Stimulation zu einer schnelleren Erregungsleitung, sowie zu einem Anstieg von Frequenz, Schlagkraft und Erregbarkeit. Diese Wirkungen werden hauptsächlich über adrenerge Beta-1-Rezeptoren vermittelt (Kaumann 1991, Molenaar et al. 1987). Über präsynaptische Alpha-2-Rezeptoren auf postsynaptischen sympathischen Efferenzen reguliert NA die NA- und NPY-Ausschüttung (Haass et al. 1989).

Die Stimulation parasympathischer Fasern führt am Herz zu einer Abnahme von Frequenz, Schlagkraft und Erregungsleitung, wirkt also negativ chronotrop, inotrop und dromotrop (Jeck et al. 1988, Olmez et al. 1995). ACh entfaltet seine Wirkung am Meerschweinchenherzen über muskarinerge M2-Rezeptoren, die hauptsächlich im Vorhofbereich lokalisiert sind (Jeck et al. 1988, Schulze et Fu 1996, Zhu et al. 1996). An kardialen Neuronen hat ACh unterschiedliche Effekte. Einerseits führt es über die Aktivierung muskarinerger M1-Rezeptoren zur Depolarisation kardialer Neurone und somit zu einer erleichterten Signalübertragung, andererseits erzeugt es durch die Stimulation muskarinerger M2-Rezeptoren eine Membranhyperpolarisation und somit eine reduzierte Neurotransmission (Allen et Burnstock 1990). Eine weitere Möglichkeit, Einfluss auf die Herzaktion zu nehmen, besteht in der Stimulation präsynaptischer M2- und M3-Rezeptoren



auf postganglionären sympathischen (Haunstetter et al. 1994, Olmez et al. 1995) und präsynaptischer M2-Rezeptoren auf postganglionären parasympathischen Efferenzen (Jeck et al. 1988). Im Rahmen elektrischer Feldstimulations-Studien konnte gezeigt werden, dass es nach M2-Rezeptorstimulation zu einer deutlich verringerten NA-, NPY- und ACh-Ausschüttung aus den entsprechenden Nervenendigungen kommt (Jeck et al. 1988, Haunstetter et al. 1994). ACh stimuliert die NO-Freisetzung aus kardialen Endothelzellen und reduziert so indirekt den koronaren Gefäßtonus (Kelm et Schrader 1990, Yoshiyama et al. 1993).

NO hat über eine Stimulation der Guanylatzyklase und einen konsekutiven Anstieg des cGMP eine negativ inotrope Wirkung auf das Herz und führt zu einer verstärkten diastolischen Ventrikel-Relaxation (Kelm et al. 1991, 1997). NO inhibiert den positiv inotropen und chronotropen Effekt einer Betarezeptorenstimulation (Strasser et al. 1992) sowie den negativ chronotropen Effekt einer Vagusstimulation (Herring et al. 2000). NO ist außerdem ein wichtiger Vasodilatator der Koronargefäße mit Einfluss auf den koronaren Ruhetonus (Kelm et Schrader 1990, Kelm et al. 1991, 1997).

VIP führt am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen zu einer dosisabhängigen Frequenzsteigerung, zu einer Abnahme der Kontraktilität und zu einem Abfall des koronaren Gefäßwiderstandes (Hoover 1989). Beim Menschen und Meerschweinchen bewirkt VIP bei systemischer Gabe einen Abfall des systemischen und koronaren Gefäßwiderstandes (Sata et al. 1986, Smitherman et al. 1989, Lundberg et al. 1994), bei intrakoronarer Gabe führt es beim Menschen zu einem Abfall des aortalen Mitteldrucks und des kardialen Sauerstoffverbrauchs bei gleichzeitigem Anstieg der linksventrikulären Inotropie und des Spitzendrucks (Popma et al. 1990).

NPY hat beim Meerschweinchen bei systemischer Gabe einen gering positiv chronotropen und inotropen Effekt (Lundberg et al. 1984), führt zu einem lang anhaltenden Anstieg des koronaren Gefäßwiderstandes (Franco-Cereceda et al. 1985) und inhibiert die durch ACh und VIP ausgelöste Koronargefäß-Relaxation (Gulbenkian et al. 1992). Auch an den Koronargefäßen des Menschen und der Ratte wirkt NPY als potenter Vasokonstriktor (Grundmar et al. 1992, Tseng et al. 1988). Bei der Ratte und beim Schwein bewirkt NPY bei systemischer Gabe einen dosisabhängigen Anstieg des arteriellen Blutdrucks, ohne jedoch die Herzfrequenz zu steigern (Modin et al. 1991, Grundemar et al. 1992, Dahlof et al. 1988). Neben seiner direkten Wirkung auf postsynaptische Effektorzellen scheint NPY

über Rezeptoren auf postganglionären sympathischen (Lundberg et al. 1984, Wahlestedt et al. 1987) und prä- und postganglionären parasympathischen Nervenendigungen Einfluss auf die NA- und ACh-Freisetzung zu nehmen (Lundberg et al. 1984, Wahlestedt et al. 1987, Pardini et al. 1992). An parasympathischen kardialen Neuronen führt eine lokale Applikation von NPY zu einer deutlichen Hyperpolarisation und so wahrscheinlich zu einer reduzierten Signalübertragung (Kennedy et al. 1998).

### 1.3.3 Pulmonale Gefäße

Im intakten und perfundierten pulmonalen Gefäßbett führt die Stimulation postganglionärer sympathischer Nervenfasern zu einem stimulationsfrequenzabhängigen Anstieg des Perfusionsdrucks und des Gefäßwiderstandes (Kadowitz et al. 1976).

NA, welches von postganglionären sympathischen Nervenendigungen ausgeschüttet wird, entfaltet seine Wirkung über verschiedene Rezeptorsubtypen. Von den Subtypen der Betarezeptoren ist am pulmonalen Gefäßbett vor allem der Beta-2-Rezeptor beschrieben worden (Molenaar et al. 1987, Hyman et al. 1990). Zirkulierende Katecholamine und lokal freigesetztes NA entfalten an diesem Rezeptor eine vasodilatatorische Wirkung (Kubota et al. 1988, Mazzuco et al. 1999). Eine vasokonstriktorische Wirkung hingegen wird direkt via postsynaptische Alpha-1- und Alpha-2-Rezeptoren sowie indirekt via präsynaptische Beta-Rezeptoren auf sympathischen Nervenendigungen vermittelt (Kubota et al. 1985, 1988, Kuwahara et al. 1986, Misu et al. 1981, Hyman et Kadowitz 1986, Hyman et al. 1990).

Die Auswirkungen von ACh auf die pulmonale Durchblutung hängt stark von den jeweiligen muskarinergen Rezeptoren ab. Beim Meerschweinchen überwiegen, ähnlich wie beim Menschen, M3-Rezeptoren, die endothelabhängig eine Relaxation der arteriellen Pulmonalgefäße vermitteln (Mak et Barnes 1989, 1990, McCormack et al. 1988). Durch vagale Stimulation freigesetztes ACh bewirkt am Gefäßendothel eine NO-Freisetzung, welche ihrerseits zur Vasodilatation führt (McMahon et al. 1992). An humanen Pulmonalarterien bewirkt ACh eine Relaxation, die verschwindet, sobald das Gefäßendothel entfernt wird. Unter diesen Bedingungen führt ACh zu einer geringgradigen Kontraktion der glatten Gefäßwandmuskulatur (Greenberg et al. 1987).

NO endothelialen und neuronalen Ursprungs führt zu einer Minderung des pulmonalen Gefäßwiderstandes bei Mensch und Meerschweinchen (Scott et al. 1996, Scott et McCormack 1999). Durch elektrische Feldstimulation lässt sich zeigen, dass NO an der Meerschweinchenpulmonalarterie zu einer frequenzabhängigen Relaxation führt und so als Antagonist der adrenergen Gefäßkontraktion wirkt (Liu et al. 1992).

VIP führt bei systemischer Gabe bei Menschen und Meerschweinchen zu einer Relaxation des pulmonalen Gefäßbettes und so zu einem Abfall des pulmonalen Gefäßwiderstandes (Hand et al. 1984, Kubota et al. 1985, Smitherman et al. 1989). Diese durch VIP ausgelöste Gefäßerweiterung der Pulmonalarterie des Meerschweinchens ist ausgeprägt, langanhaltend (Saga et Said 1984) und endothelunabhängig (Sata et al. 1986).

NPY bewirkt wie NA bei systemischer Gabe einen Anstieg des bronchialen und pulmonalen Gefäßwiderstands (Franco-Cereceda et al. 1995). NPY führt als Synergist des NAs auch bei in vitro Versuchen zu einer pulmonalen Vasokonstriktion (Obara et al. 1989).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beim Meerschweinchen eine neurogene, pulmonale Gefäßkontraktion über adrenerge Alpharezeptoren vermittelt wird. Betaadrenerge und cholinerge Rezeptoren haben einen leicht relaxierenden Einfluss, während der Hauptteil der neurogenen Gefäßrelaxation über nichtadrenerge-nichtcholinerge Mechanismen vermittelt wird (Kubota et al. 1988).

#### **1.4 Ziel dieser Untersuchung**

Ziel dieser Studie war es, die Lokalisation der vasoaktiven Peptide NPY und VIP und der Stickstoffmonoxid bildenden NOS in Relation zu dem ACh bildenden Enzym ChAT in Nervenfasern und Nervenzellkörpern der Thoraxorgane des Meerschweinchens zu untersuchen. Von Interesse war vor allem, ob die 'neueren' Transmittersubstanzen NO, NPY und VIP als Kotransmitter des AChs und des NAs zu betrachten sind, oder ob die aus vielen funktionellen Untersuchungen bekannte nichtadrenerge-nichtcholinerge autonome Innervation einem eigenständigen anatomischen System entspricht.

Anhand der Koloalationen der oben genannten Transmittersubstanzen in autonomen Nervenfasern in den Atemwegen, im Herzen und in den pulmonalen Gefäßen sollten

Rückschlüsse auf deren wahrscheinliche Ursprungsneurone und auf die bei deren Ausschüttung zu erwartenden prä- und postsynaptische Interaktionen gezogen werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Antikörper**

**Primärantikörper** (aufgeführt sind Antigen, Lot-Nummer, Ursprungsspezies, eingesetzte Verdünnung und Bezugsquelle).

Primär-AK	Lot-Nummer	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Cholinazetyltransferase (ChAT)	18050018	Ziege	1:400	Chemicon International Inc. (Temecula, CA, U.S.A.)
Anti-Neuropeptid Y (NPY)	1702	Kaninchen	1:1000	Amersham International (Buckinghamshire, England)
Anti-Neuropeptid Y (NPY)	85061	Schaf	1:1000	Auspep (Bedford Park, Australien)
Anti-neuronale NO-Synthase (NOS)		Kaninchen	1:1000	Dr. B. Mayer (Graz, Österreich)
Anti-neuronale NO-Synthase (NOS)	18040837	Schaf	1:1600	Chemicon International Inc. (Temecula, CA, U.S.A.)
Anti-Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP)		Kaninchen	1:1000	Prof. Dr. S. Bläher (Giessen, Deutschland)

Tabelle 1

**Sekundärantikörper** (aufgeführt sind Antigen, Konjugat, Ursprungsspezies, eingesetzte Verdünnung und Bezugsquelle). FITC=Fluoresceinisothiocyanat.

Sekundär-AK	Konjugat	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Schaf/Ziege-IgG	Biotin	Esel	1:400	Amersham International (Buckinghamshire, England)
Anti-Kaninchen-IgG	FITC	Ziege	1:400	ICN Pharmaceuticals (Aurora, Ohio, U.S.A.)

Tabelle 2

**Tertiärreagenz** (aufgeführt sind Lot-Nummer, eingesetzte Verdünnung und Bezugsquelle).

Tertiärreagenz	Lot-Nummer	Verdünnung	Bezugsquelle
Streptavidin-Texasrot	1233	1:4000	Amersham International (Buckinghamshire, England)

Tabelle 3

### 2.1.2 Reagenzien

**Blocklösung** 10% normales Schweineserum, 0,5% Tween 20 und 0,1% bovines Serumalbumun in PBS (Phosphate-buffered saline).

**Carbonatgepuffertes Glycerol** Carbonatpuffer (0,5 M  $\text{NaHCO}_3$  mit 0,5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 8,6) und Glycerol im Verhältnis eins zu zwei mischen.

**Phosphatpuffer 0,1 M** 230 ml 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 770 ml 0,1 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4).

**PBS** 28,75 ml 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , und 96,20 ml 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  mischen, 22,4 g NaCl zugeben und mit Aqua dest. auf 5 l auffüllen.

**PBS/NaCl** PBS mit doppelter NaCl Menge.

**Vorspüllösung** 25 g Polyvinylpyrrolidon (MG 40 000), 9 g NaCl und 5 g Procainhydrochlorid in 1 l Aqua dest. lösen, den pH auf 7,4 einstellen, filtrieren und unmittelbar vor der Perfusion 2 ml Heparin zugeben (Forssmann et al. 1977).

**Fixationslösung** 40 g Paraformaldehyd in 0,5 l Aqua dest. auf 70 °C erhitzen, einige Tropfen 2 M NaOH zugeben bis die Lösung klar wird, abkühlen lassen, 0,5 l Phosphatpuffer (0,2 M) zugeben, pH 7,4 einstellen, filtrieren

**Objektträgerbeschichtung** 0,5 g Chromalaun und 5 g Gelatine in 1 l Aqua dest. auf 40°C erwärmen und lösen. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur Lösung filtrieren und die autoklavierten Objektträger 10 Minuten lang hineingetauchen. Bei 37°C die so beschichteten Objektträger über Nacht trocknen lassen.

### 2.1.3 Geräte

Gerät / Material	Typ / Hersteller
Gefriermikrotom	Leica CM 1900, Firma Leitz (Wetzlar, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX 60 (Hamburg, Deutschland)
Filme	Schwarz-Weiß-Film TMY 400 der Firma Kodak

Tabelle 4

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gewebeaufarbeitung**

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf Meerschweinchen mit unterschiedlichem Geschlecht und einem Gewicht zwischen 200-250 g untersucht (Bezugsquelle: Harlan Winkelmann, Wabern, BRD).

Nach Tötung durch Chloroformgas wurden die Tiere thorakotomiert und der Herzbeutel eröffnet. Über den linken Ventrikel wurden sie mit jeweils 200 ml Vorspüllösung gefolgt von 500 ml Fixationslösung perfundiert. Über einen kleinen Schnitt im rechten Vorhof wurde ein Abfluss geschaffen und so die orthograde Durchströmung des großen und die retrograde Durchströmung des kleinen Kreislaufes gewährleistet.

Nach einer Stunde wurden das gesamte Thoraxpaket herauspräpariert, mehrmals in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und nach 24-stündiger Immersion in 18%iger Saccharose in 0,1 M Phosphatpuffer schockgefroren.

Von dem gefrorenen Gewebe wurden im Gefriermikrotom 12 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt und auf mit Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträgern aufgenommen. Die Schnitte wurden anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und dann bis zur weiteren Verarbeitung bei –20 °C gelagert.

### **2.2.2 Immunfluoreszenz**

Sämtliche Versuchsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Gewebsschnitte wurden zunächst zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen für eine Stunde mit einer proteinhaltigen Blocklösung vorinkubiert. Diese Blocklösung beinhaltete außerdem das Detergenz Tween 20, um die Penetration der Antikörper in das Gewebe bei den anschließenden Versuchsschritten zu gewährleisten. Nach zweimaligem Waschen der Schnitte in PBS-Pufferlösung für jeweils 10 Minuten wurden die jeweiligen Primärantikörper in den ausgetesteten Verdünnungen in PBS/NaCl aufgetragen und über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurde zur Detektion der vom Kaninchen stammenden Primärantikörper ein in PBS/NaCl verdünnter



FITC-konjugierter anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus der Ziege für eine Stunde aufgetragen. Zur Darstellung der von Ziege und Schaf stammenden Primärantikörper wurde zunächst ein in PBS/NaCl verdünnter biotinierter anti-Schaf/Ziege-IgG-Antikörper aus dem Esel, gefolgt von mit Texasrot markiertem Streptavidin aufgetragen. Auch diese Schritte dauerten jeweils eine Stunde und zwischen den Schritten wurde zweimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen. Am Schluss wurden die Schnitte erneut gewaschen und mit gepuffertem Glycerol, welches die Lichtdurchlässigkeit des unmarkierten Gewebes erhöht und das pH-empfindliche FITC vor zu schnellem Zerfall bewahrt, eingedeckelt.

### 2.2.3 Doppelimmunfluoreszenz

Um im Rahmen der sogenannten Doppelimmunfluoreszenz zwei unterschiedliche Antigene gemeinsam auf einem Gewebsschnitt darzustellen, müssen die zwei hierfür verwandten Primärantikörper unterschiedlichen Spezies entstammen. Nach einstündiger Inkubation mit Blocklösung und zweimaligem, zehnminütigem Waschen in PBS wurden in einem ersten Schritt jeweils ein vom Kaninchen stammender gemeinsam mit einem vom Schaf/Ziege stammenden Primärantikörper in ausgetesteter Verdünnung in PBS/NaCl auf die Schnitte gegeben. Die Schnitte wurden dann in einer feuchten Kammer über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem, zehnminütigem Waschen in PBS wurde die Schnitte mit dem in PBS/NaCl verdünnten biotinierten anti-Schaf/Ziege-IgG-Antikörper inkubiert. Auf einen erneuten Waschschrift folgte eine zehnminütige Inkubation mit 5%igem Schafserum in PBS/NaCl, um eventuelle freie Bindungsstellen des bereits gebundenen anti-Schaf/Ziege-Sekundärantikörper abzusättigen. Hiermit sollte einer späteren Bindung des im kommenden Schritt aufzutragenden, von der Ziege stammenden FITC-konjugierten Sekundärantikörper vorgebeugt werden. Auf erneutes Waschen in PBS folgte die einstündige Inkubation mit dem FITC-konjugierten anti-Kaninchen-IgG und dem mit Texasrot markierten Streptavidin, welches an den biotinierten Sekundärantikörper aus Schritt zwei angelagert wurde.

Als letzter Schritt folgte nach erneutem Waschen die Eindeckelung der Schnitte in gepuffertem Glycerol. Die Spezifität der Primärseren wurde bereits zuvor in üblicher Weise

(Forssmann et al. 1988) durch Präabsorptionstests, die der Sekundärseren durch Ersatz des Primärantikörpers durch normales Serum der gleichen Spezies überprüft.

#### 2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie ist die Darstellung fluoreszierender Objekte, in diesem Fall der fluorochrommarkierten Antigen-Antikörper-Komplexe. Durch Bestrahlung mit kurzwelligem oder ultraviolettem Licht kommt es zur Anregung dieser Fluorochrome, die ihrerseits Licht einer längeren Wellenlänge abstrahlen und nach Abfilterung des anregenden Lichtes auf dunklem Hintergrund aufleuchten. Da die beiden Fluorochrome FITC und Texasrot durch Licht unterschiedlicher Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden, kann die Lokalisation zweier Antigene fluoreszenzmikroskopisch differenziert werden.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop, wobei für FITC ein B2-Modul (Filterkombination: Erregerfilter BP 520-560 nm, Sperrfilter BP 450-492 nm) und für Texasrot ein G1-Modul (Filterkombination: Erregerfilter LP 590 nm; Sperrfilter BP 546/10 nm) verwandt wurde

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 ChAT-, NOS-, NPY- und VIP-Immunreaktivität in Nervenzellkörpern und Nervenfasern der Brustraumorgane des Meerschweinchens**

##### **3.1.1 ChAT-Immunreaktivität**

Um die Verteilung cholinergischer Nervenfasern und Nervenzellkörper in den Atemwegen, dem Herzen und den pulmonalen Gefäßen des Meerschweinchens darzustellen, wurde ein polyklonales Antiserum gegen ChAT benutzt. Innerhalb der Atemwege und des Herzens entsprach das Ergebnis dieser Untersuchung dem früherer Studien, in denen ein anderes polyklonales Serum gegen ChAT zur Darstellung cholinergischer Strukturen verwandt wurde (Mawe et al. 1996, Canning et Fischer 1997). ChAT-immunreaktive Fasern waren in der gesamten glatten Atemwegsmuskulatur von der Trachea bis zu den terminalen Bronchiolen zu finden. Seltener kamen ChAT-immunreaktive Nervenfasern in der Tela submucosa von Trachea und größeren Bronchien und nur vereinzelt in der Tunica adventitia der extrapulmonalen Atemwege vor. Sämtliche intrinsischen Atemwegsneurone entlang der Trachea und der Bronchien waren ChAT-immunreaktiv.

Im Herzen innervierten ChAT-immunreaktive Fasern das Reizleitungssystem, das Arbeitsmyokard der Vorhöfe und in geringerem Maße der Ventrikel, lokale Neurone und die Koronargefäße. Alle intrinsischen Ganglienzellen waren immunreaktiv für ChAT.

In arteriellen Pulmonalgefäßen waren ChAT-immunreaktive Fasern nahezu nicht nachweisbar. Allenfalls herznahe Abschnitte des Truncus pulmonalis zeigten vereinzelte ChAT-immunreaktive Fasern, die in deutlichem Abstand zur muskulären Gefäßwand blieben. Intrapulmonale Arterien wurden nicht durch ChAT-immunreaktive Fasern innerviert.

Pulmonalvenen zeigten nur in den von Herzmuskulatur aufgebauten Gefäßwandabschnitten ChAT-immunreaktive Nervenfasern. Intrapulmonale Venen ohne Mantel aus Kardiomyozyten zeigten keine Innervation durch ChAT-immunreaktive Fasern.

### 3.1.2 NOS-Immunreaktivität

Um Nervenfasern darzustellen, die Stickstoffmonoxid als Neurotransmitter benutzen, wurden zwei polyklonale Antiseren gegen NOS eingesetzt. Eines dieser beiden Antiseren hatte bereits in früheren Studien über die Innervation von Atemwegen, Herz und Pulmonalgefäßen des Meerschweinchens Verwendung gefunden und zu gleichen Ergebnissen geführt (Klimaschewski et al. 1992, Fischer et al. 1993, Haberberger et al. 1997).

NOS-immunreaktive Fasern waren in der glatten Atemwegsmuskulatur, bevorzugt in extrapulmonalen Anteilen, zu finden. Einzelne Nervenfasern kamen außerdem in der Tunica adventita und der Tela submucosa der extrapulmonalen Atemwege vor. Intrinsische Atemwegsneurone zeigten keine NOS-Immunreaktivität.

Im Herzen ließ sich NOS-Immunreaktivität in lokalen Ganglienzellen und in Fasern, die das Reizleitungssystem, das Vorhofmyokard, lokale Neurone und die Koronararterien innervieren, darstellen.

Pulmonalarterien wurden extrapulmonal und intrapulmonal von NOS-immunreaktiven Fasern innerviert, deren Häufigkeit zur Peripherie hin abnahm, während Pulmonalvenen nur in ihren extrapulmonalen Abschnitten NOS-immunreaktive Fasern aufwiesen.

### 3.1.3 NPY-Immunreaktivität

NPY-immunreaktive Nervenfasern wurden in der vorliegenden Studie unter Verwendung zweier polyklonaler Primärantiseren dargestellt. In beiden Fällen entsprachen Dichte und Verteilung der markierten Fasern den Ergebnissen früherer Studien (Kummer et al. 1992).

NPY-immunreaktive Fasern waren sehr zahlreich in der Tunica adventitia der extrapulmonalen Atemwege zu finden. In der glatten Atemwegsmuskulatur waren NPY-immunreaktive Fasern von der Trachea bis zu den Bronchioli terminales mit abnehmender Häufigkeit darzustellen. Die Tela submucosa war bis in die Lungenperipherie hinein durch NPY-immunreaktive Fasern innerviert.

Intrinsische Atemwegsneurone zeigten keine Immunreaktivität für NPY.

Im Herzen war ein dichtes Netz NPY-immunreaktiver Fasern darzustellen. Außer dem Arbeitsmyokard der Vorhöfe und Ventrikel innervierten NPY-immunreaktive Fasern das Reizleitungssystem, lokale Neurone und die Koronargefäße. Etliche kardiale Ganglienzellen zeigten NPY-Immunreaktivität unterschiedlicher Intensität.

Zahlreiche NPY-immunreaktive Fasern waren entlang des gesamten arteriellen und venösen Pulmonalgefäßstammes nachweisbar.

#### 3.1.4 VIP-Immunreaktivität

Um die Häufigkeit und Verteilung VIP-immunreaktiver Fasern zu untersuchen, wurde ein polyklonales Primärantiserum gegen VIP angewandt. In Atemwegen und Lunge entsprach das Ergebnis dem früherer Studien, in denen andere polyklonale Antiseren gegen VIP benutzt wurden (Kummer et al. 1992). VIP-immunreaktive Fasern waren bevorzugt in der glatten Atemwegsmuskulatur von Trachea und größeren Bronchien zu finden. Vereinzelt kamen sie in der Tunica adventitia und der Tela submucosa der extrapulmonalen Atemwege vor. Lokale Ganglienzellen zeigten keine Immunreaktivität für VIP.

Im Herzen waren VIP-immunreaktive Fasern insgesamt selten zu beobachten. Sie waren vor allem im Reizleitungssystem und im Vorhof lokalisiert und kamen in kardialen Ganglien, im Endokard des Vorfofs und im Epikard vor. Intrinsische kardiale Neurone zeigten keine VIP-Immunreaktivität.

Im Bereich der Lungengefäße zeigten die VIP-immunreaktiven Nervenfasern eine ähnliche Verteilung wie die NOS-immunreaktive Fasern. Pulmonalarterien wurden von ihnen regelmäßig, jedoch zur Lungenperipherie hin abnehmend innerviert. Pulmonalvenen wurden vergleichsweise selten und bevorzugt in ihren herznahen Abschnitten von VIP-immunreaktiven Nervenfasern versorgt.

## **3.2 Koexistenz von ChAT-, NOS-, NPY- und VIP-Immunreaktivität in Nervenzellkörpern und Nervenfasern**

### **3.2.1 ChAT und NOS**

In den Atemwegen, wo vor allem die Muskulatur von ChAT- und NOS-immunreaktiven Fasern innerviert wurde, gab es fast keine Kolo-kalisationen. ChAT-immunreaktive Fasern waren nicht NOS-immunreaktiv und NOS-immunreaktive Fasern zeigten keine Immunreaktivität für ChAT (Abb. 1).

Die Atemwegsneurone zeigten alle ChAT-Immunreaktivität, waren jedoch nicht NOS-immunreaktiv.

NOS-immunreaktive Fasern waren in der Adventitia und Muskularis der pulmonalen Arterien zu finden. Ihre Zahl nahm zur Lungenperipherie hin ab, und sie wiesen grundsätzlich keine ChAT-Immunreaktivität auf (Abb. 2).

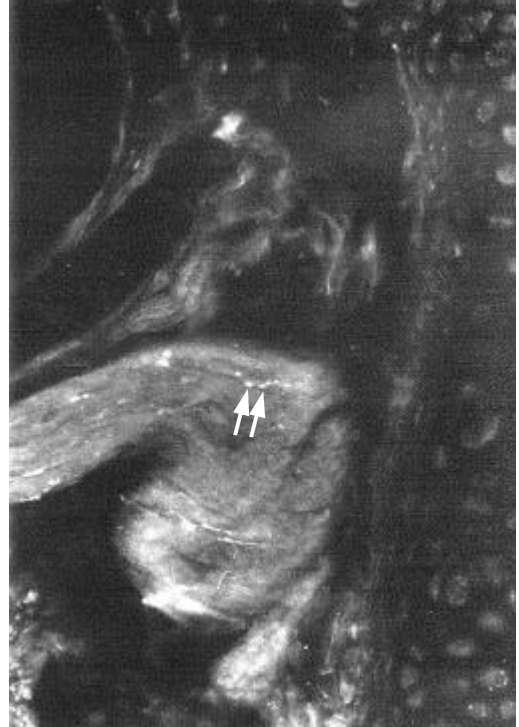
Die Pulmonalvenen zeigten nur in den von Herzmuskulatur gebildeten Gefäßabschnitten regelmäßig ChAT- und NOS-immunreaktive Nervenfasern. Erstere waren mengenmäßig stärker vertreten. Ähnlich wie im Myokard war nur ein geringer Prozentsatz dieser Fasern sowohl ChAT- als auch NOS-immunreaktiv. Die Mehrzahl der Fasern zeigte für nur eines der beiden Enzyme Immunreaktivität (Abb. 2, Abb. 3).

Im Bereich der Herzmuskulatur überwogen die ChAT-immunreaktiven Nervenfasern eindeutig gegenüber den NOS-immunreaktiven Fasern. Während die ChAT-immunreaktiven Fasern vor allem im Vorhofmyokard ein dichtes Netzwerk bildeten, waren NOS-immunreaktive Fasern bevorzugt in subepikardialen Myokardabschnitten zu finden. Die Mehrzahl der ChAT-immunreaktiven Fasern war nicht immunreaktiv für NOS, und auch die NOS-immunreaktiven Fasern wiesen selten ChAT-Immunreaktivität auf. Nur vereinzelt ließen sich die beiden Enzyme in der gleichen Nervenfaser darstellen (Abb. 4, Abb. 5).

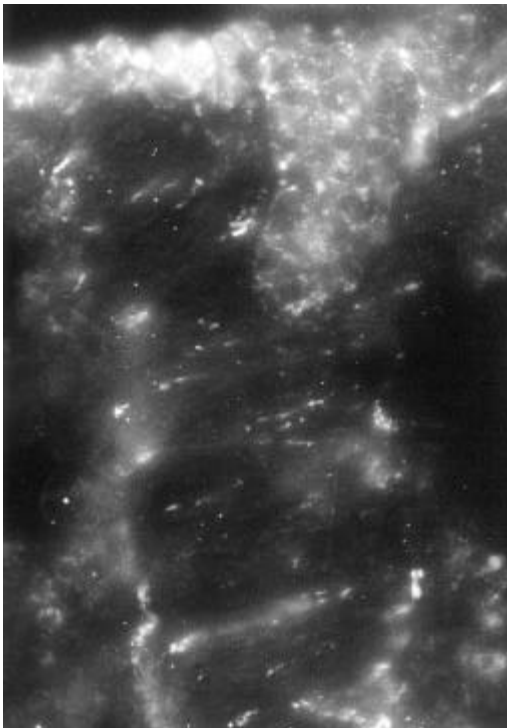
In den Herzganglien waren alle Neurone ChAT- und ein geringer Prozentsatz NOS-immunreaktiv. Im Bereich der Faserkörbe, die die Herzneurone umgeben, stellten sich ChAT und NOS als nicht kolo-kalisiert dar (Abb. 5, Abb. 6).



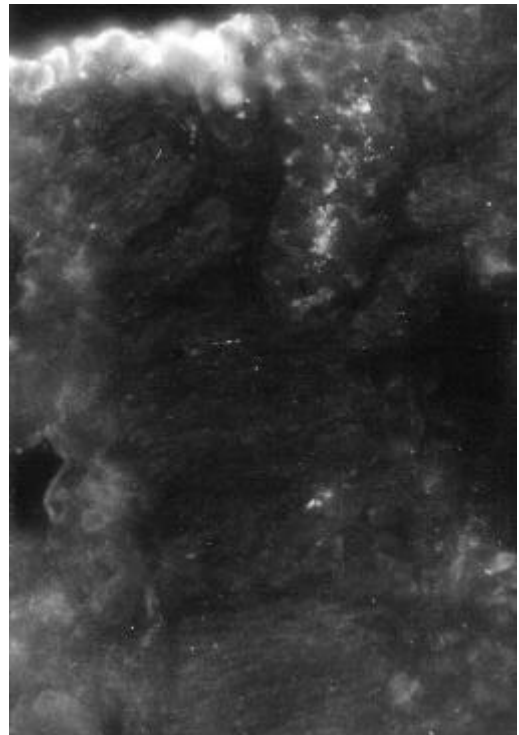
a) Pulmonaler Bronchus, ChAT (x40)



b) Pulmonaler Bronchus, NOS (x40)

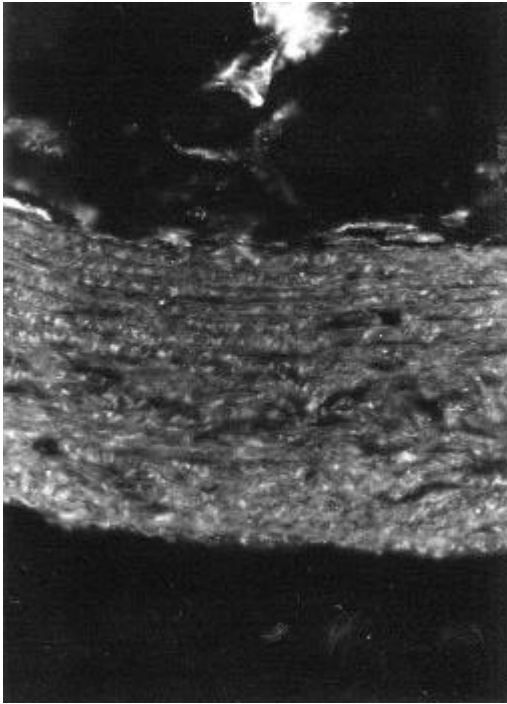


c) Hauptbronchus, ChAT (x40)

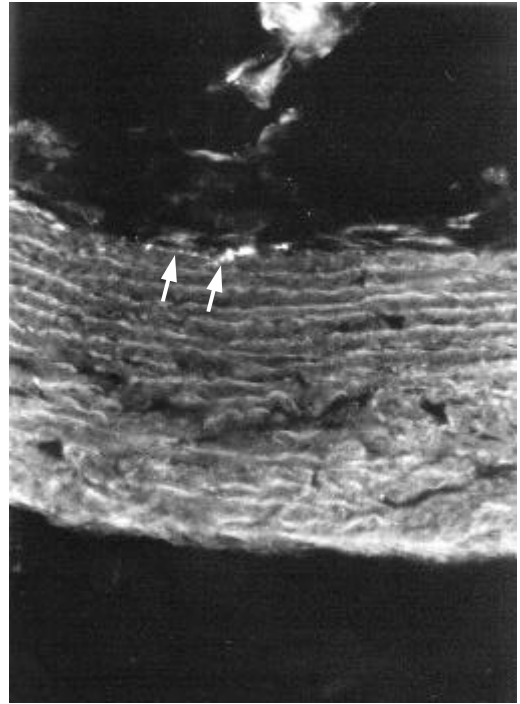


d) Hauptbronchus, NOS (x40)

**Abb. 1:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung eines pulmonalen Bronchus- (a,b) sowie eines Hauptbronchusanschnittes (c,d). Die glatte Atemwegsmuskulatur ist sowohl intra- (a) als auch extrapulmonal (c) von einem dichten Netzwerk ChAT-immunreaktiver Nervenfasern innerviert. NOS-immunreaktive (b,d) Fasern sind seltener vertreten, und nur vereinzelt lassen sich beide Enzyme in der gleichen Nervenfaser darstellen (Pfeile).



a) Truncus pulmonalis, ChAT (x40)



b) Truncus pulmonalis, NOS (x40)



c) Pulmonalvene, ChAT (x40)

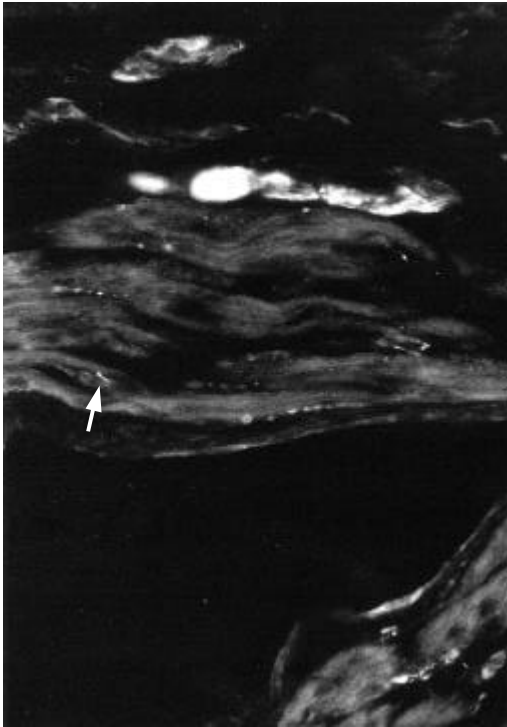


d) Pulmonalvene, NOS (x40)

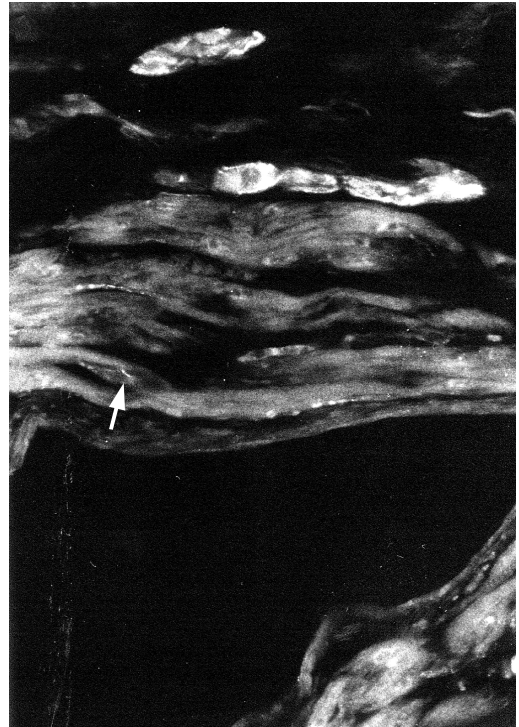
**Abb. 2:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung eines Truncus pulmonalis- (a,b) und eines Pulmonalvenenanschnittes (c,d). Eine NOS-immunreaktive (b) Nervenfasern in der Adventitia des Truncus pulmonalis (Pfeile) weist keine ChAT-Immunreaktivität (a) auf.

ChAT- (c) und NOS-immunreaktive (d) Fasern in einem herznahen Pulmonalvenenanschnitt (kleine Pfeile). Nur ein geringer Prozentsatz der hier vorkommenden Fasern zeigt Immunreaktivität sowohl für ChAT als auch für NOS.

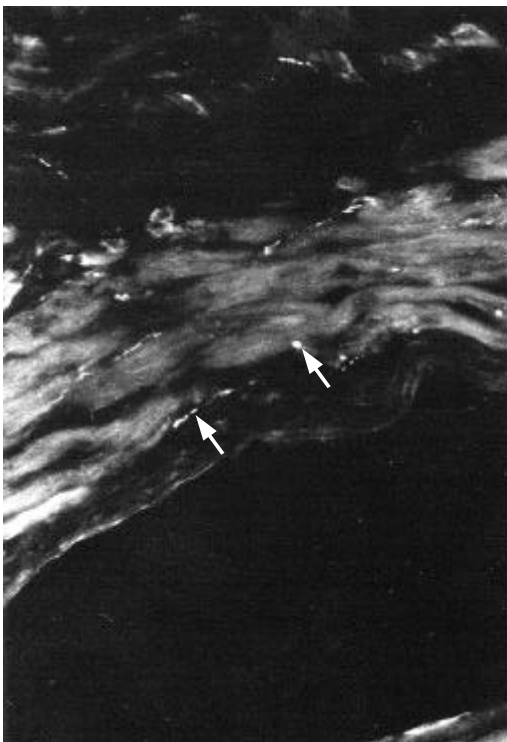




a) Pulmonalvene, ChAT (x40)



b) Pulmonalvene, NOS (x40)

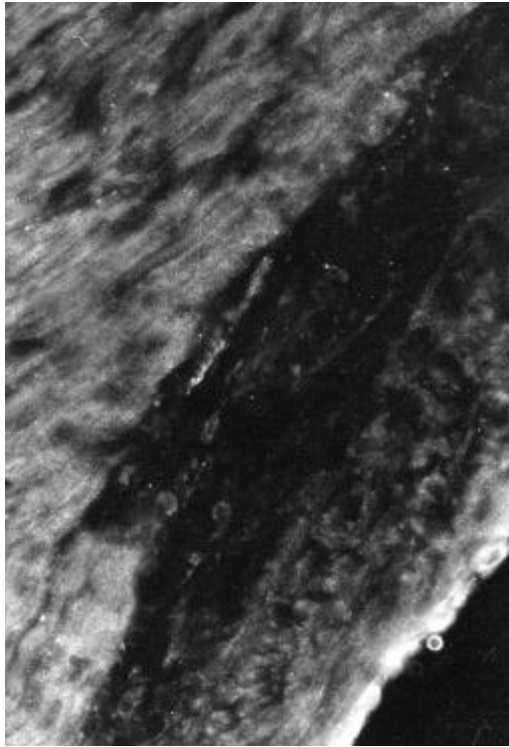


c) Pulmonalvene, ChAT (x40)

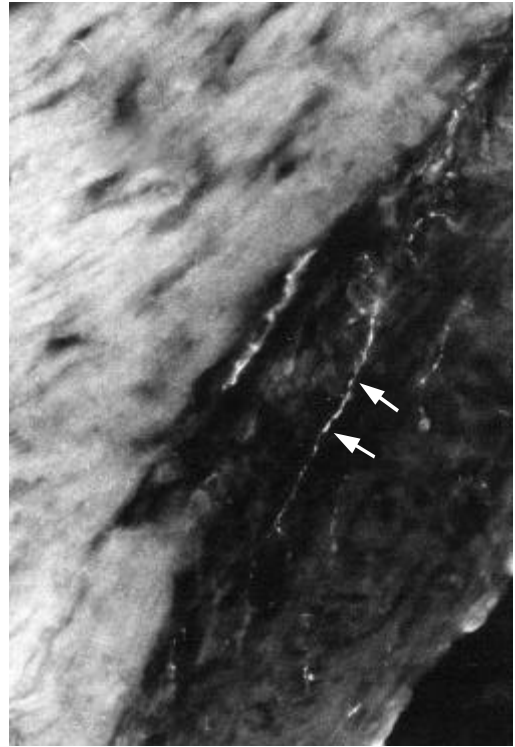


d) Pulmonalvene, NOS (x40)

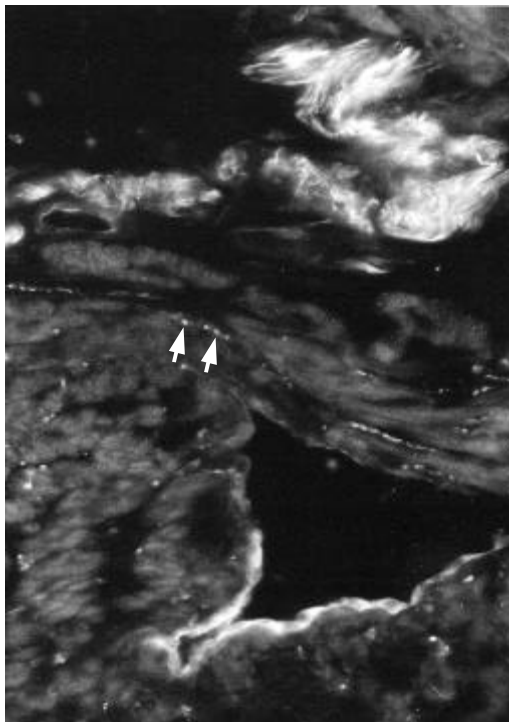
**Abb. 3:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung zweier herznaher Pulmonalvenenanschnitte (a,b sowie c,d). ChAT- (a,c) und NOS-immunreaktive (b,d) Nervenfasern und Nervenzellkörper sind in herznahen Lungenvenenanschnitten oft zu finden. So, wie alle dargestellten ChAT-immunreaktiven (a) Nervenzellkörper auch NOS-Immunreaktivität (b) aufweisen, zeigen einige der dargestellten Nervenfasern Immunreaktivität für beide Enzyme (Pfeile).



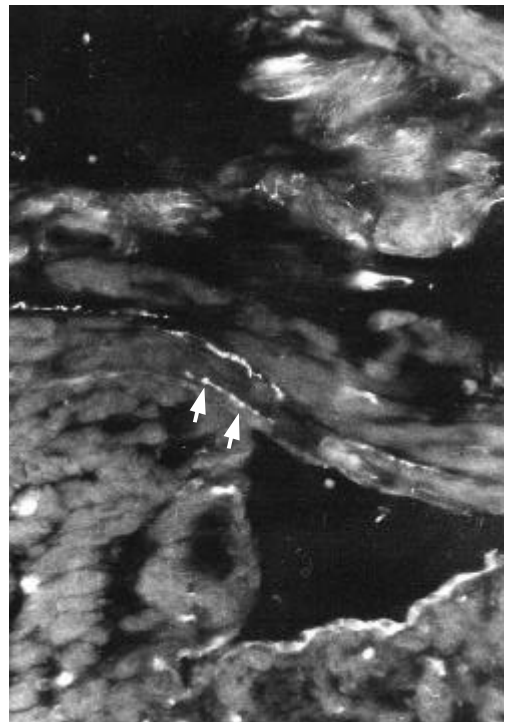
a) Herz, ChAT (x40)



b) Herz, NOS (x40)



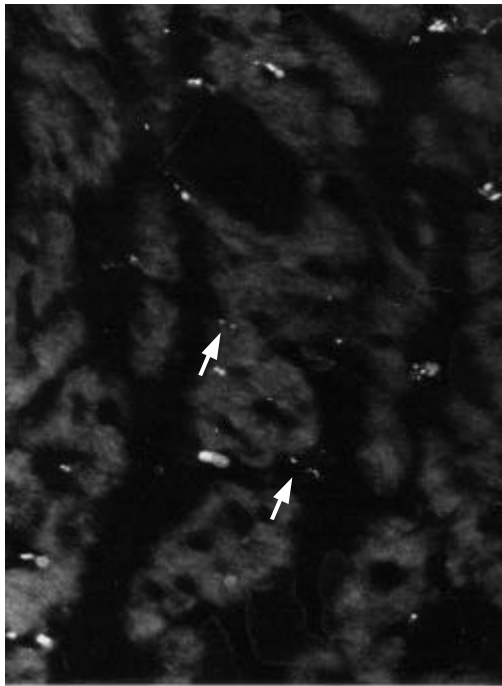
c) Herz, ChAT (x40)



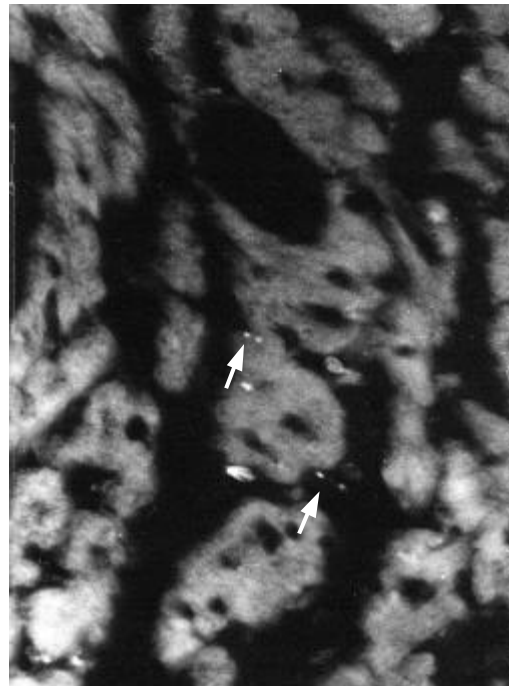
d) Herz, NOS (x40)

**Abb. 4:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung zweier Herzanschnitte (a,b sowie c,d). In subepikardialen Myokardabschnitten lassen sich zahlreiche NOS-immunreaktive (b) Nervenfasern darstellen, die häufig keine ChAT-Immunreaktivität (a) aufweisen (Pfeile).

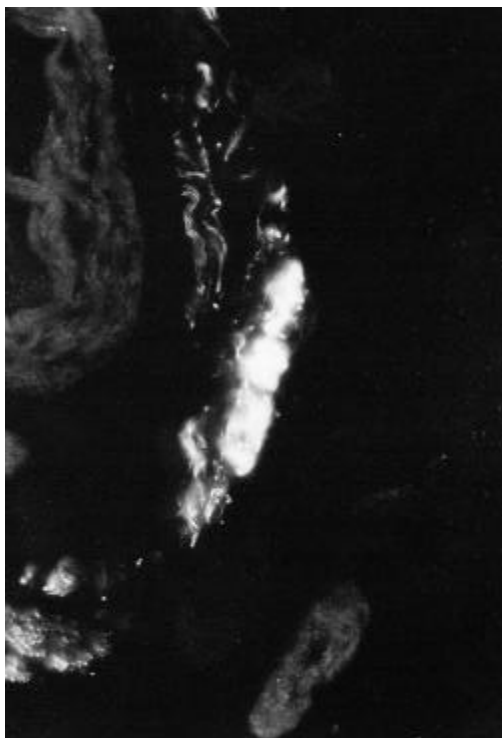
Häufig weisen ChAT-immunreaktive (c) Fasern keine NOS-Immunreaktivität (d) auf und umgekehrt (kleine Pfeile).



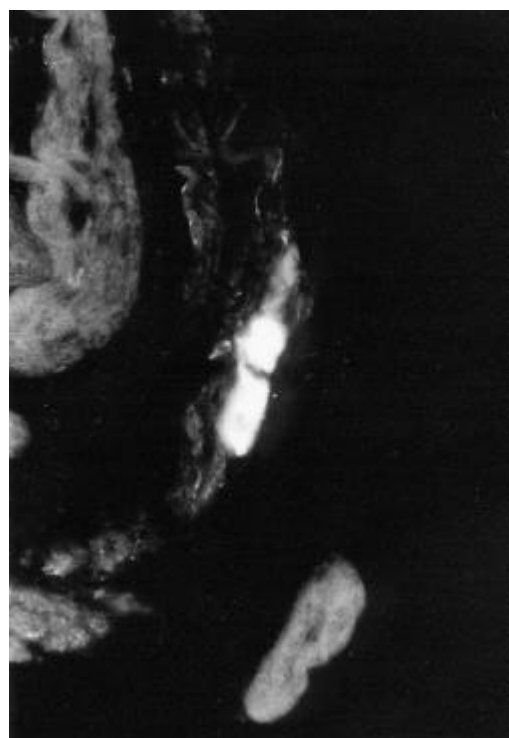
a) Myokard, ChAT (x40)



b) Myokard, NOS (x40)



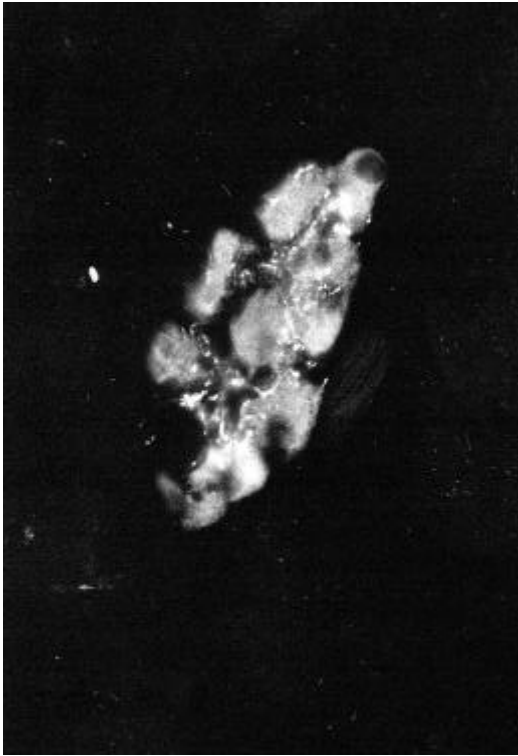
c) Herzganglion, ChAT (x40)



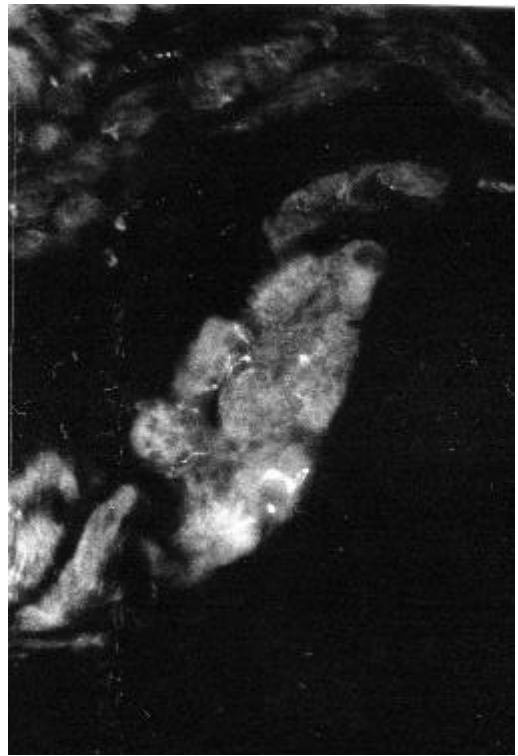
d) Herzganglion, NOS (x40)

**Abb. 5:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung eines Herzmuskel- (a,b) und eines Herzganglionanschnittes (c,d). Im Myokard überwiegen ChAT- (a) gegenüber NOS-immunreaktiven (b) Fasern. Vergleichsweise selten, wie hier dargestellt (Pfeile), lassen sich beide Enzyme in Nervenfasern kolokalisieren.

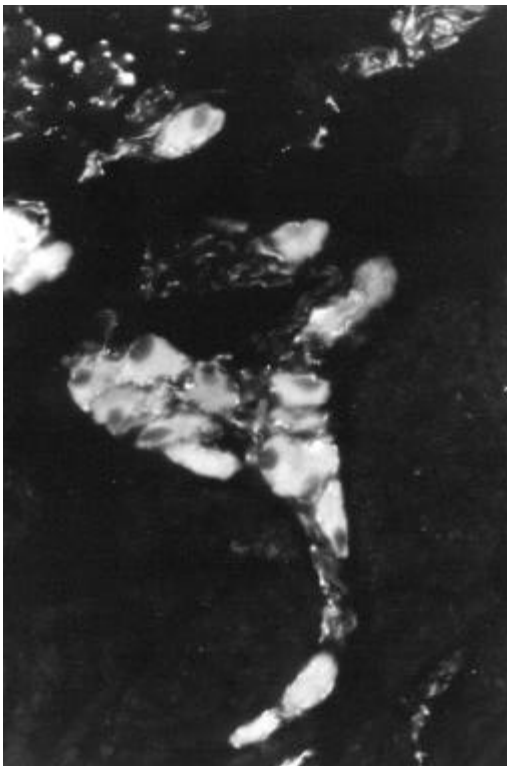
Während alle Neurone in Herzganglien ChAT-immunreaktiv (c) sind, ist NOS-Immunreaktivität (d) nur in einem geringen Prozentsatz dieser Nervenzellkörper darzustellen.



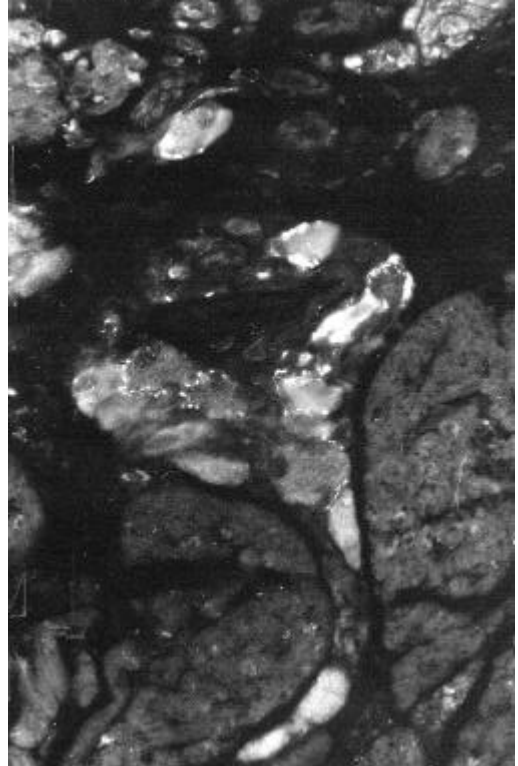
a) Herzganglion, ChAT (x40)



b) Herzganglion, NOS (x40)



c) Herzganglion, ChAT (x40)



d) Herzganglion, NOS (x40)

**Abb. 6:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung zweier Herzganglion-Anschnitte (a,b und c,d). In den Faserkörben, die die Herzneurone umgeben, stellen sich ChAT (a,c) und NOS (b,d) als nicht kolokalisiert dar.

### 3.2.2 ChAT und NPY

In den Atemwegen waren ChAT-immunreaktive Fasern vor allem in der Muskulatur, NPY-immunreaktive Fasern in Muskulatur, Adventitia und Submukosa lokalisiert. Erneut waren ChAT-immunreaktive Fasern nicht NPY-immunreaktiv, und NPY-immunreaktive Fasern zeigten keine ChAT-Immunreaktivität (Abb. 7).

Neurone der Atemwegsganglien waren grundsätzlich ChAT-, jedoch nicht NPY-immunreaktiv.

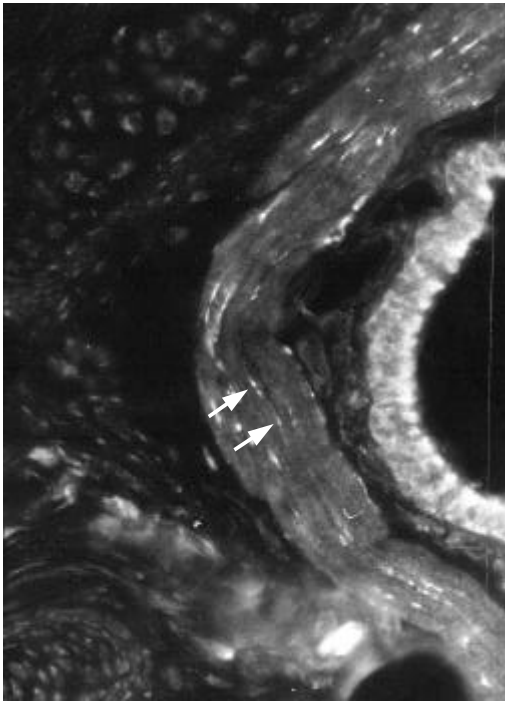
Die im Bereich der Pulmonalarterien zahlreich vorkommenden NPY-immunreaktiven Fasern wiesen grundsätzlich keine ChAT-Immunreaktivität auf (Abb. 7).

Die Pulmonalvenen waren nur in ihren herznahen Abschnitten durch ChAT-immunreaktive Nervenfasern innerviert, während NPY-immunreaktive Fasern bis in die Lungenperipherie hinein darstellbar waren. Auch hier waren ChAT und NPY nur in Ausnahmefällen kolokalisiert (Abb. 8).

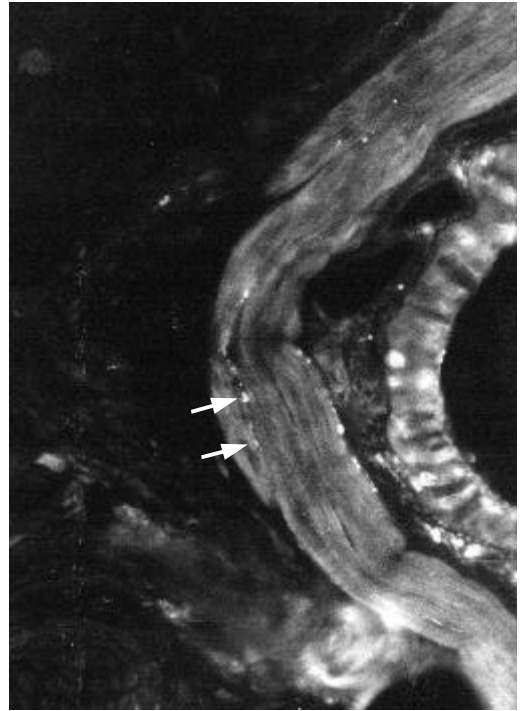
Die Herzmuskulatur zeigte eine ausgeprägte Innervation sowohl durch ChAT- als auch durch NPY-immunreaktive Fasern. Während NPY-immunreaktive Nervenfasern im Vorhof- und Ventrikelmuskulatur darstellbar waren, waren ChAT-immunreaktive Fasern bevorzugt in der Vorhofmuskulatur lokalisiert. In den seltensten Fällen konnten ChAT und NPY in einer Faser kolokalisiert dargestellt werden. NPY-immunreaktive Fasern zeigten zumeist keine ChAT-Immunreaktivität und umgekehrt (Abb. 9).

Die intrinsischen Neurone des Herzens zeigten alle ChAT-, einige ebenfalls NPY-Immunreaktivität. Die NPY-Immunreaktivität war hierbei von unterschiedlicher Intensität

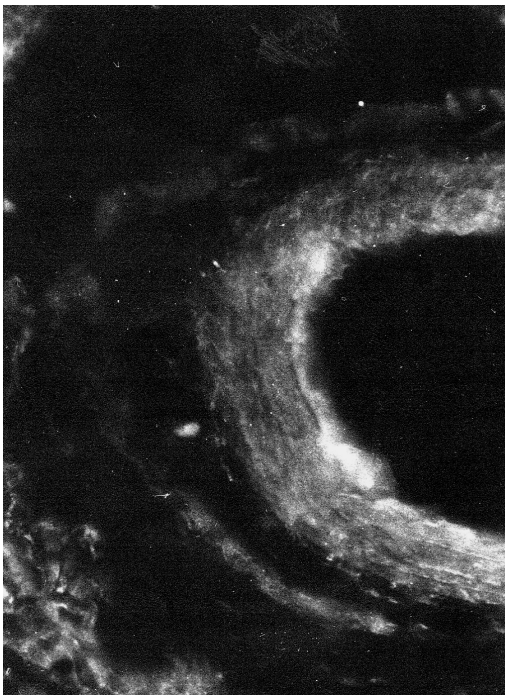
In den kardialen Ganglien waren zahlreiche ChAT- und NPY-immunreaktive, die Herzneurone umspinnende Faserkörbe zu erkennen. NPY-immunreaktive Faserkörbe waren ChAT-negativ und ChAT-immunreaktive Faserkörbe zeigten keine Immunreaktivität für NPY (Abb. 10).



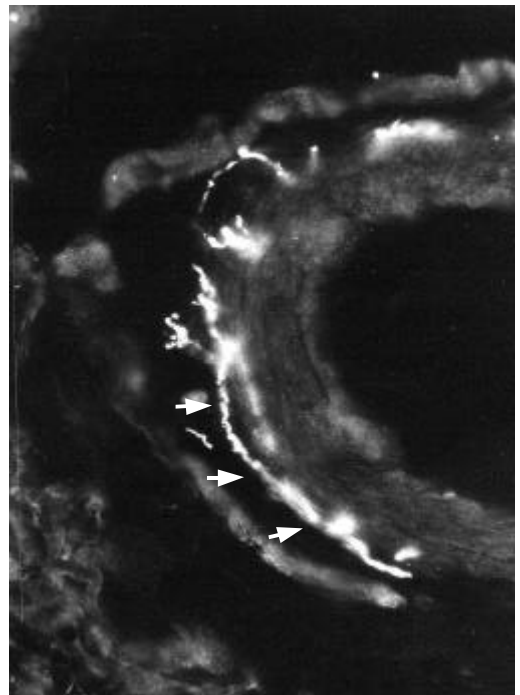
a) Hauptbronchus, ChAT (x40)



b) Hauptbronchus, NPY (x40)



c) Pulmonalarterie, ChAT (x40)

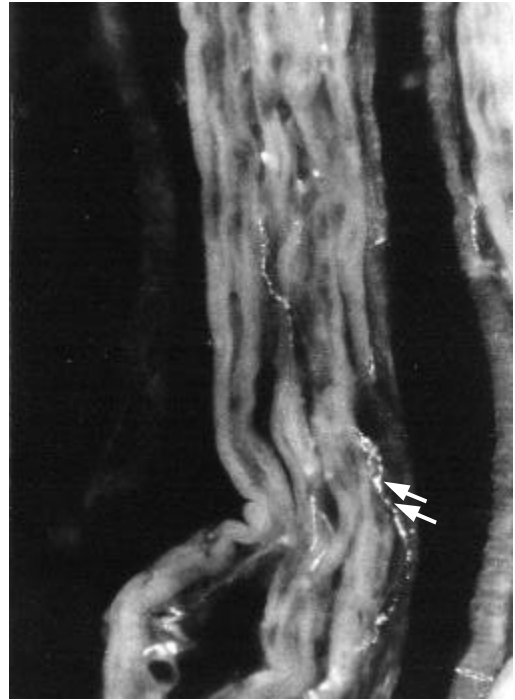


d) Pulmonalarterie, NPY (x40)

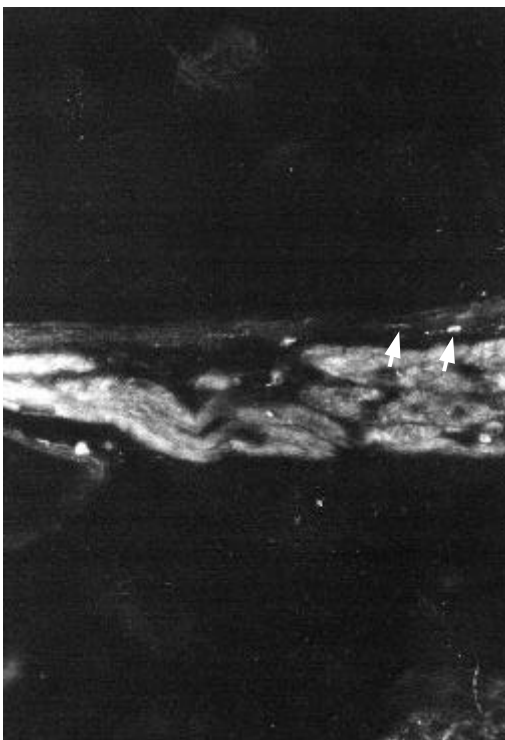
**Abb. 7:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung eines extrapulmonalen Hauptbronchus- (a,b) sowie eines Pulmonalarterienanschnittes (c,d). Im Anschnitt des extrapulmonalen Bronchus zeigen die zahlenmäßig stärker vertretenen ChAT-immunreaktiven (a) Fasern keine NPY-Immunreaktivität (b) und umgekehrt (Pfeile). Während der Anschnitt einer lungennahen Pulmonalarterie zahlreiche NPY-immunreaktive (d) Fasern zeigt (kleine Pfeile), lassen sich ChAT-immunreaktive (c) Fasern nicht darstellen.



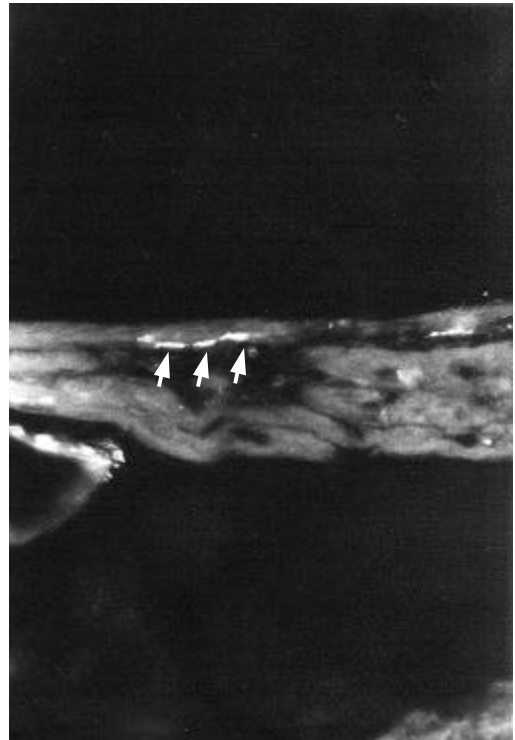
a) Pulmonalvene, ChAT (x40)



b) Pulmonalvene, NPY (x40)



c) Pulmonalvene, ChAT (x40)



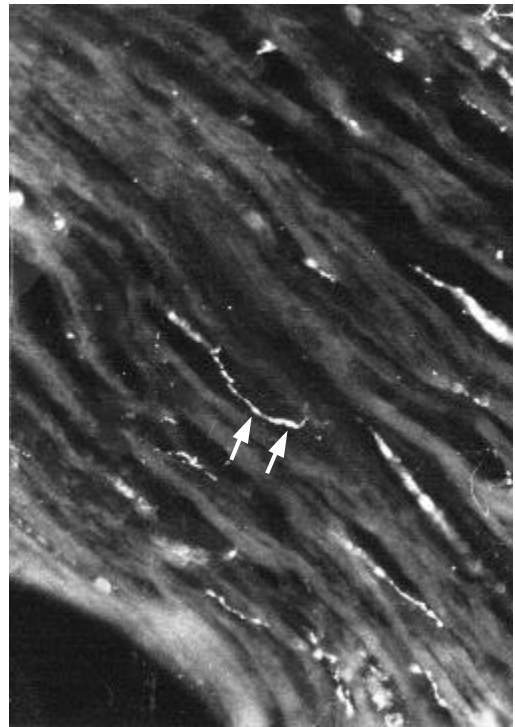
d) Pulmonalvene, NPY (x40)

**Abb. 8:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung zweier Pulmonalvenenanschnitte (a,b sowie c,d). Herznahe Pulmonalvenen werden sowohl von ChAT- (a,c), als auch von NPY-immunreaktiven (b,d) Nervenfasern innerviert. Selten lassen sich beide in den selben Nervenfasern kolokalisieren (a,b) (Pfeile), in der Regel sind ChAT und NPY jedoch nicht kolokalisiert (c,d) (kleine Pfeile).

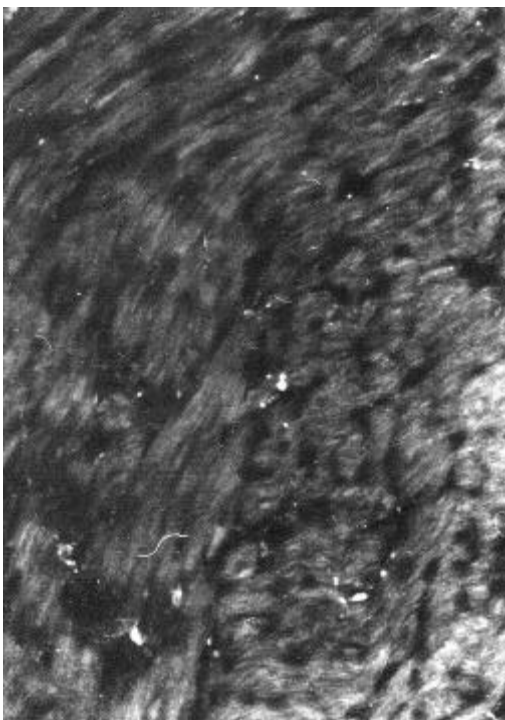




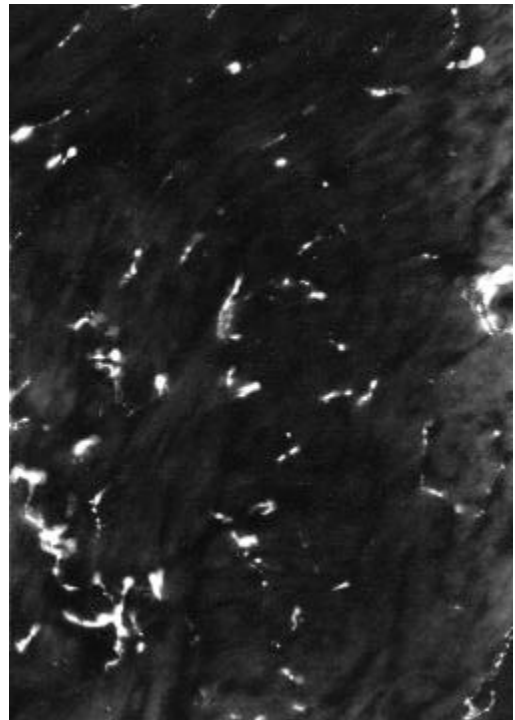
a) Myokard, ChAT (x40)



b) Myokard, NPY (x40)



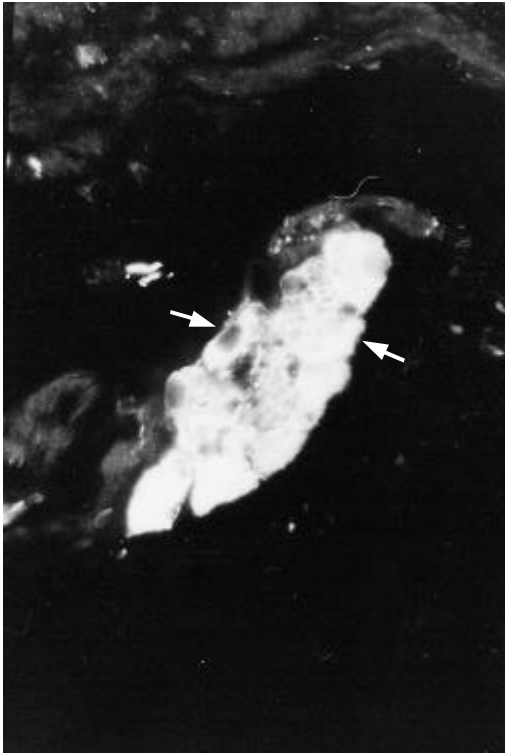
c) Myokard, ChAT (x40)



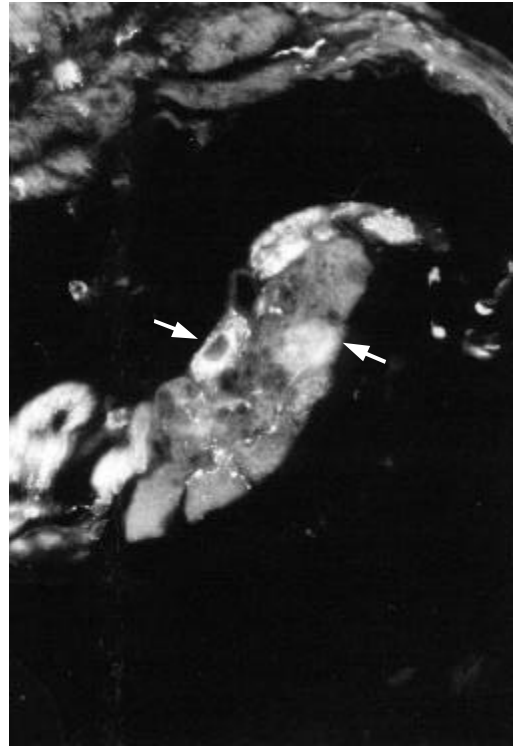
d) Myokard, NPY (x40)

**Abb. 9:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung zweier Herzmuskelanschnitte (a,b sowie c,d). Das Myokard wird von einem dichten Netzwerk ChAT- (a,c) und NPY-immunreaktiver (b,d) Nervenfasern innerviert. Nur in Ausnahmefällen sind ChAT (a) und NPY (b), wie in den oberen zwei Bildern dargestellt, kolokalisiert (Pfeile). Meistens lassen sich ChAT (c) und NPY (d) in unterschiedlichen Fasern darstellen.





a) Herzganglion, ChAT (x40)



b) Herzganglion, NPY (x40)

**Abb. 10:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung eines Herzganglionanschnittes. Einige der ChAT-immunreaktiven (a) Herzneurone zeigen zusätzlich Immunreaktivität für NPY (b) (Pfeile). In den Faserkörben, die die Herzneurone umspinnen, sind ChAT und NPY nicht kolokalisiert darzustellen.

### 3.2.3 ChAT und VIP

Die Atemwege waren vor allem im Bereich der Atemwegsmuskulatur von einem dichten Netz ChAT-immunreaktiver Fasern durchzogen. VIP-immunreaktive Fasern waren bevorzugt in der glatten Muskulatur von Trachea und großen Bronchien lokalisiert. In der Regel zeigte sich keine Kolo-kalisation von ChAT- und VIP-Immunreaktivität in diesen Atemwegsfasern (Abb. 11). Die intrinsischen Atemwegsneurone zeigten alle ChAT-Immunreaktivität, aber keine Immunreaktivität für VIP.

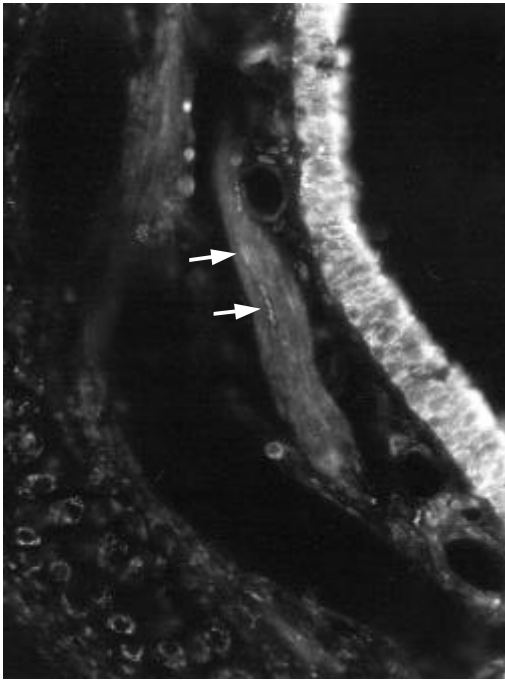
Die Pulmonalarterien zeigten eine regelmäßige, zur Lungenperipherie hin abnehmende Innervation mit VIP-immunreaktiven Nervenfasern. Diese VIP-immunreaktiven Fasern, die sowohl in der Tunica adventitia als auch in der Gefäßwandmuskulatur zu finden waren, zeigten keine ChAT-Immunreaktivität (Abb. 11).

Die Lungenvenen waren nur in ihren herznahen Abschnitten, in denen die Gefäßwand durch Herzmuskulatur aufgebaut wird, regelmäßig durch ChAT- und VIP-immunreaktive Fasern innerviert. Die zahlenmäßig überwiegenden ChAT-immunreaktiven Fasern waren auch hier nicht VIP-immunreaktiv und die VIP-immunreaktiven Nervenfasern waren nicht immunreaktiv für ChAT (Abb. 12).

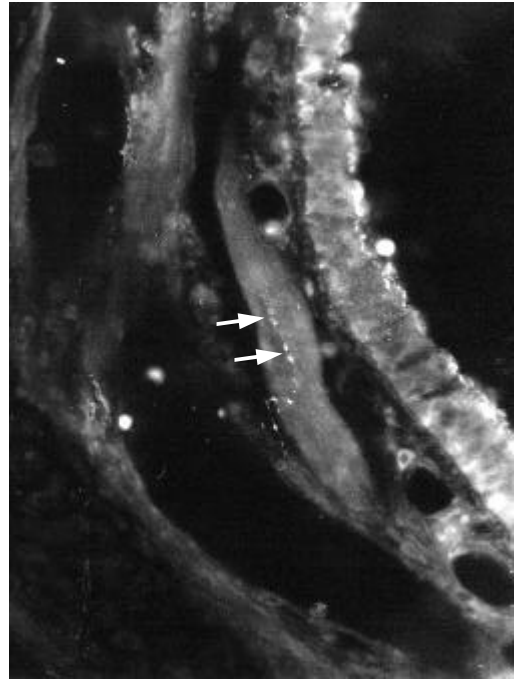
Die Herzmuskulatur war vor allem im Vorhofbereich von einem relativ dichten Netz ChAT-immunreaktiver Fasern durchzogen. VIP-immunreaktive Fasern waren dagegen nur selten und dann vor allem in subendokardialen Myokardabschnitten zu finden. ChAT-immunreaktive Nervenfasern zeigten nur in Ausnahmefällen Immunreaktivität für VIP, und VIP-immunreaktive Nervenfasern waren ihrerseits nicht ChAT-immunreaktiv (Abb. 12).

In den intrinsischen Herzneuronen, die alle ChAT-Immunreaktivität aufwiesen, war keine VIP-Immunreaktivität nachweisbar (Abb. 13).

In den Faserkörben, die die intrinsischen Herzneurone umspinnen, waren zahlreiche ChAT-immunreaktive Fasern und eine geringere Zahl VIP-immunreaktiver Fasern zu erkennen. ChAT und VIP waren auch in diesen Fasern nicht kolo-kalisiert (Abb. 13).



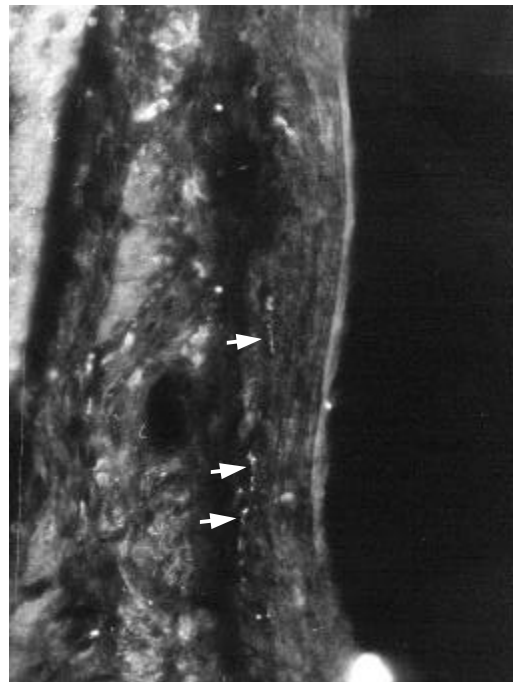
a) Hauptbronchus, ChAT (x40)



b) Hauptbronchus, VIP (x40)



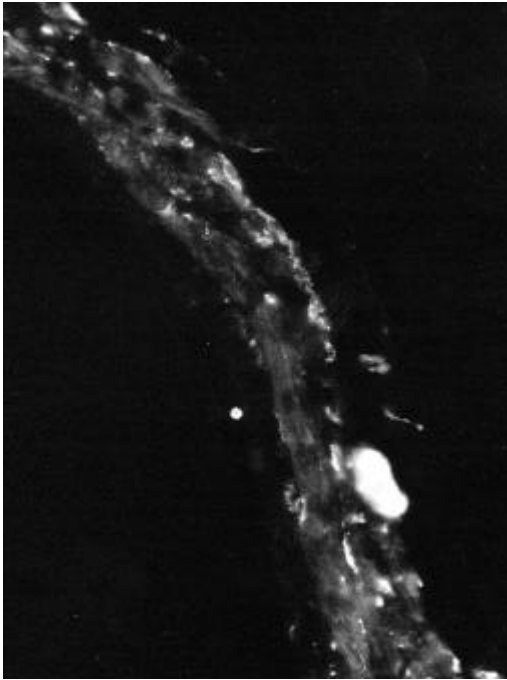
c) Pulmonalarterie, ChAT (x40)



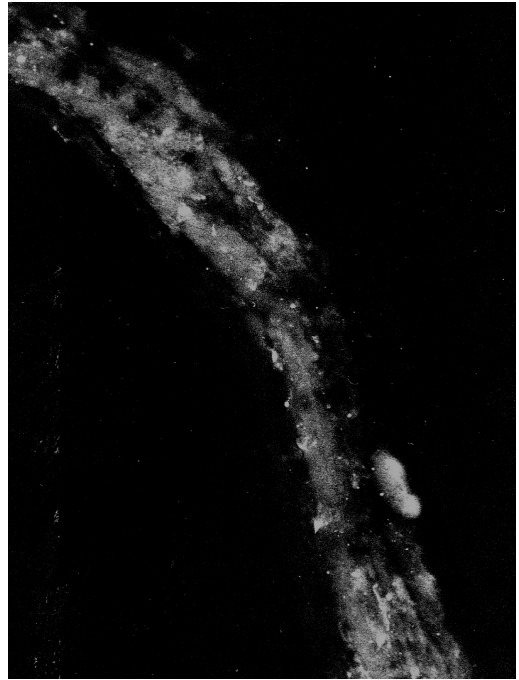
d) Pulmonalarterie, VIP (x40)

**Abb. 11:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung eines Hauptbronchus- (a,b) und eines Pulmonalarterienanschnittes (c,d). ChAT-immunreaktive (a) Nervenfasern zeigen in der glatten Atemwegsmuskulatur keine VIP-Immunreaktivität (b) und umgekehrt (Pfeile).

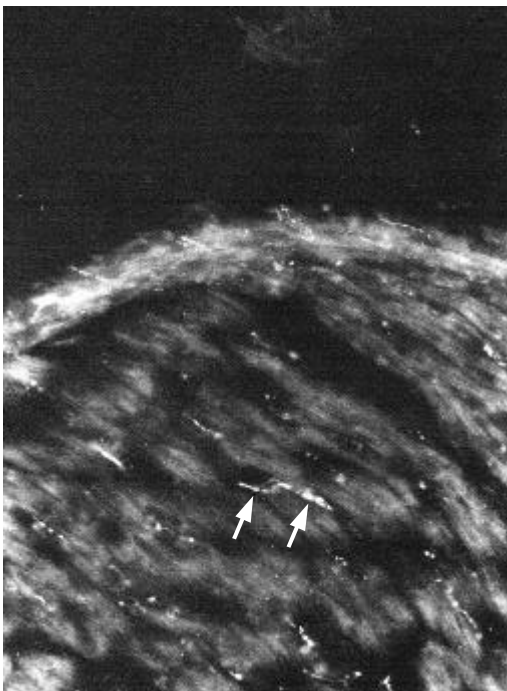
Die Adventitia der herznahen Pulmonalarterie mit angrenzenden ChAT-immunreaktiven (c) Nervenzellkörpern zeigt VIP-immunreaktive (d) Nervenfasern, die keine ChAT-Immunreaktivität (c) aufweisen (kleine Pfeile).



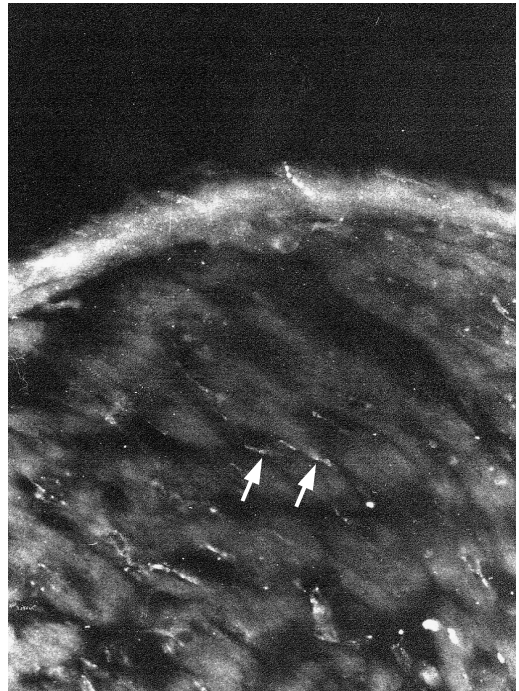
a) Pulmonalvene, ChAT (x40)



b) Pulmonalvene, VIP (x40)

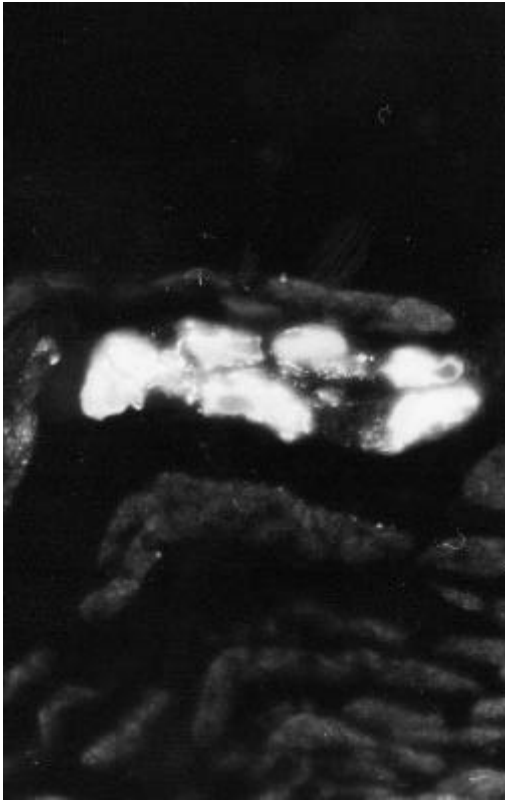


c) Myokard, ChAT (x40)

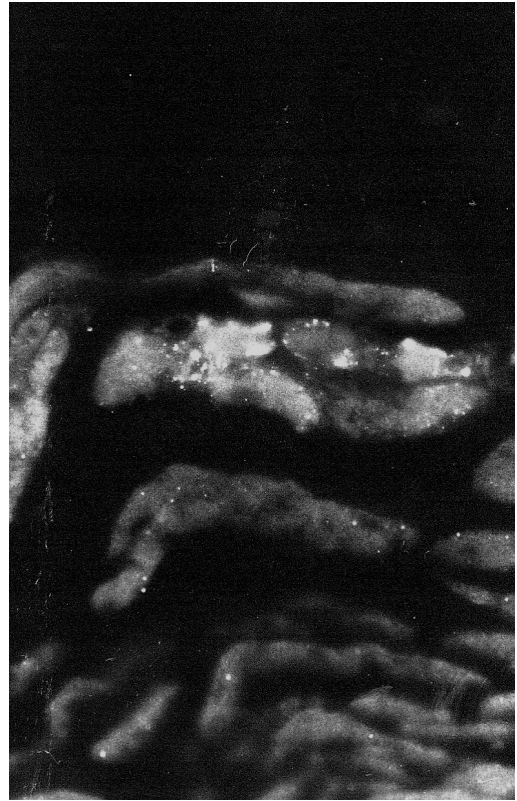


d) Myokard, VIP (x40)

**Abb. 12:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung eines Pulmonalvenen- (a,b) und eines Myokardanschnittes (c,d). Im Pulmonalvenenanschnitt zeigt die Mehrzahl der ChAT-immunreaktiven (a) Nervenfasern und Nervenzellkörper keine VIP-Immunreaktivität (b) und umgekehrt. Der in den unteren beiden Bildern dargestellte Schnitt durch den Herzmuskel zeigt neben nur ChAT-immunreaktiven (c) und nur VIP-immunreaktiven (d) Fasern den seltenen Fall der Kolokalisation von ChAT und VIP in einer Nervenfaser (Pfeile).



a) Herzganglion, ChAT (x40)



b) Herzganglion, VIP (x40)

**Abb. 13:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung eines Herzganglionanschnittes. ChAT-immunreaktive (a) Nervenzellkörper in Herzganglien zeigen keine Immunreaktivität für VIP (b). Die Faserkörbe, die diese Herzneurone umspinnen, sind jeweils nur ChAT- (a) oder VIP-immunreaktiv (b).

### 3.2.4 NOS und NPY

In den Atemwegen waren NOS-immunreaktive Fasern vor allem in der glatten Muskulatur, NPY-immunreaktive Fasern in der Adventitia, der Muskularis und in der Submukosa zu finden. Kolokalisationen von NOS und NPY waren in der Atemwegsmuskulatur häufig. Manche Fasern waren nur NOS-immunreaktiv und etliche Fasern, vor allem die in der Adventitia und Submukosa, wiesen nur für NPY Immunreaktivität auf (Abb. 14).

Die intrinsischen Atemwegsneurone waren weder für NOS noch für NPY immunreaktiv.

Die Pulmonalarterien wurden durch zahlreiche NPY-immunreaktive Fasern innerviert, die vom deren Ursprung an bis in die Lungenperipherie hinein praktisch das gesamte Gefäß umspinnen. NOS-immunreaktive Nervenfasern waren in den proximalen, großkalibrigen Pulmonalarterienabschnitten regelmäßig und zur Lungenperipherie hin abnehmend nachweisbar. Neben vielen Fasern, die nur NPY-immunreaktiv waren, und einigen, die nur Immunreaktivität für NOS zeigten, gab es auch einige Fasern, die Immunreaktivität für beide Antigene zeigten (Abb. 15).

Die Lungenvenen zeigten nur in ihren herznahen Abschnitten NOS-immunreaktive Fasern, während NPY-immunreaktive Fasern bis in die Lungenperipherie hinein darzustellen waren. Zahlenmäßig überwogen auch hier die nur NPY-immunreaktiven Fasern, daneben gab es nur NOS-immunreaktive Nervenfasern und Fasern, in denen NOS und NPY kolokalisiert waren (Abb. 16).

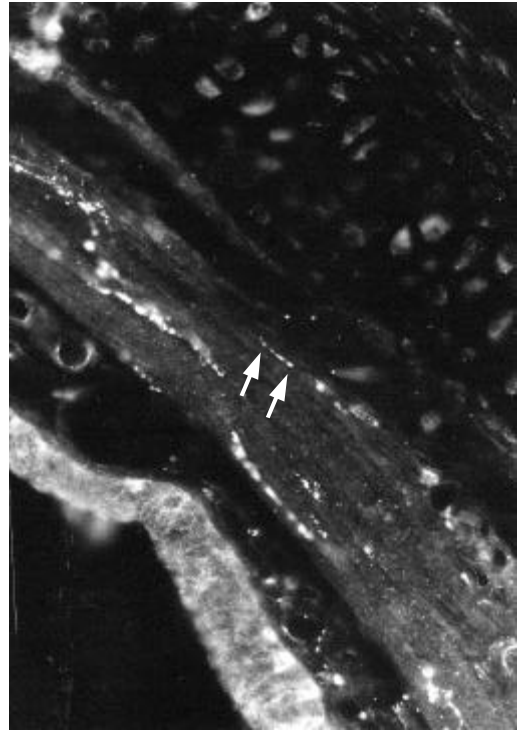
Das gesamte Arbeitsmyokard von Vorhof und Ventrikel wurde von einem dichten Netzwerk NPY-immunreaktiver Fasern durchspinnen. NOS-immunreaktive Fasern kamen deutlich seltener vor und waren vor allem in subepikardialen Myokardabschnitten lokalisiert. Neben Nervenfasern, die gegenüber nur einem der beiden Antigene Immunreaktivität zeigten, gab es zahlreiche Fasern, in denen sich NOS und NPY kolokalisiert darstellten (Abb. 16).

Die intrinsischen Herzneurone zeigten zu einem geringen Prozentsatz NOS-Immunreaktivität. NPY-Immunreaktivität ließ sich zwar häufiger, dafür aber weniger intensiv darstellen. Neben Nervenzellen, die keine Immunreaktivität zeigten, wiesen manche nur NOS-, manche nur NPY- und manche NOS- und NPY-Immunreaktivität auf. In kardialen Ganglien waren zahlreiche, die Herzneurone umspinnende Faserkörbe zu erkennen, die entweder NOS- oder NPY-Immunreaktivität zeigten. Neben diesen nur für

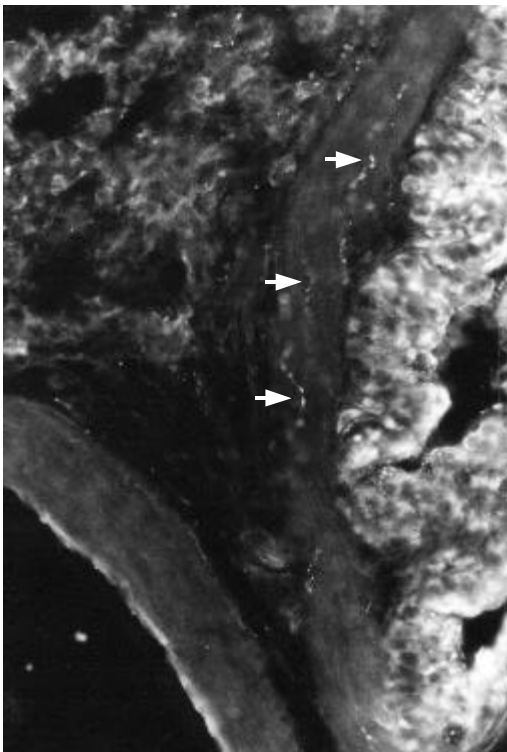
eines der beiden Antigene immunreaktiven Faserkörben gab es jedoch auch einige, die sowohl NOS- als auch NPY-immunreaktiv waren (Abb. 17, Abb. 18).



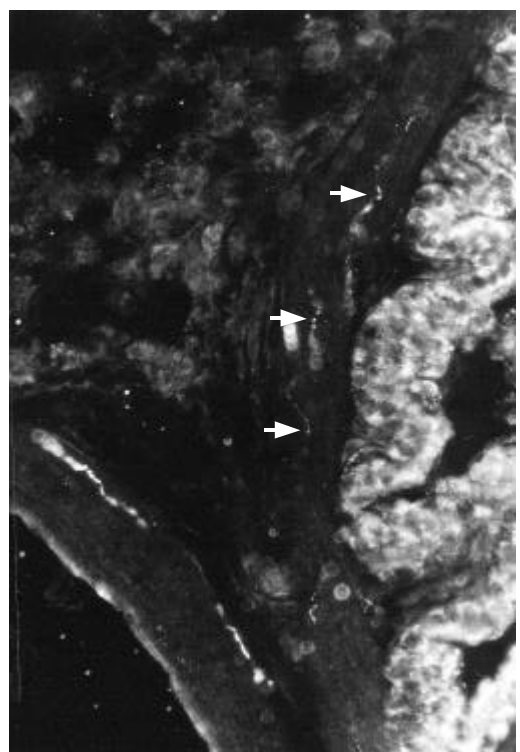
a) Hauptbronchus, NOS (x40)



b) Hauptbronchus, NPY (x40)



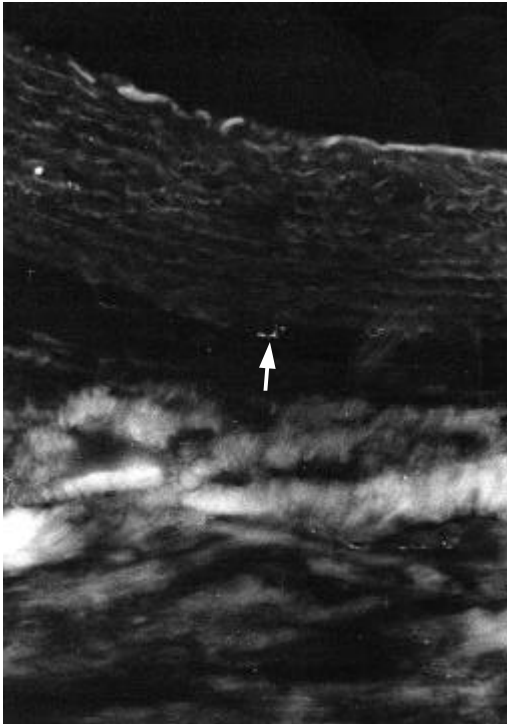
c) Bronchiolus, NOS (x40)



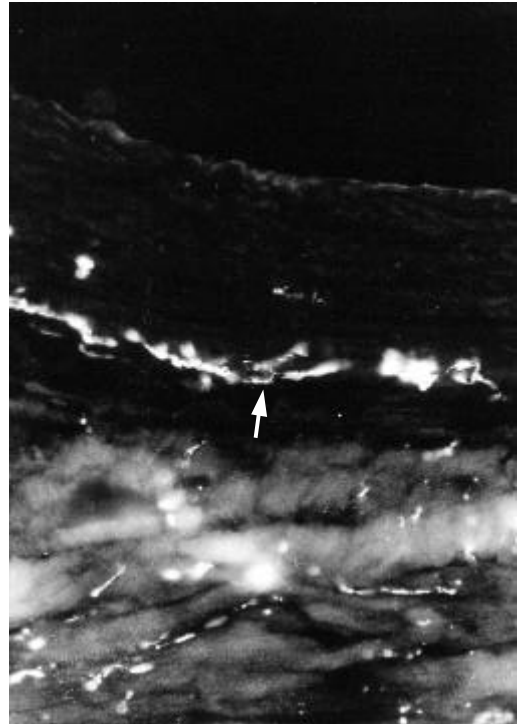
d) Bronchiolus, NPY (x40)

**Abb. 14:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung eines Hauptbronchus- (a,b) und eines Bronchiolusanschnittes (c,d). Der in den oberen beiden Bildern dargestellte Schnitt durch einen Hauptbronchus zeigt NOS (a)- und NPY (b)-immunreaktive Nervenfasern (Pfeile). NPY-immunreaktive Fasern überwiegen zahlenmäßig. In der intrapulmonalen Atemwegsmuskulatur sind NOS (c) und NPY (d) in vielen Fasern kolokalisiert (kleine Pfeile).

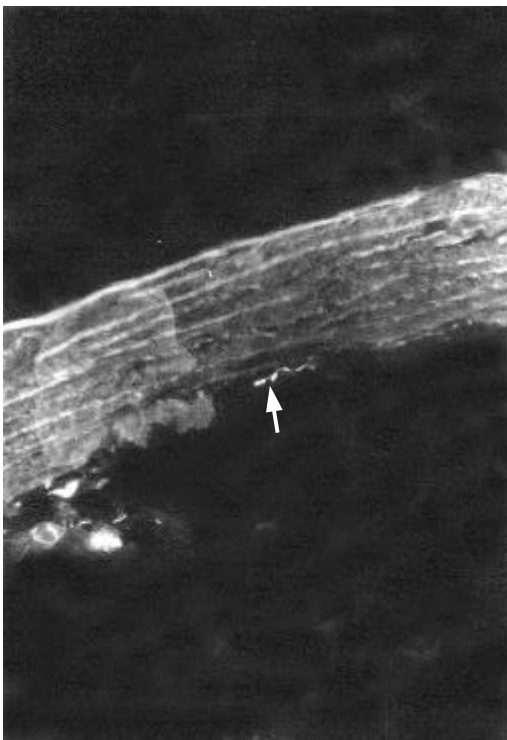




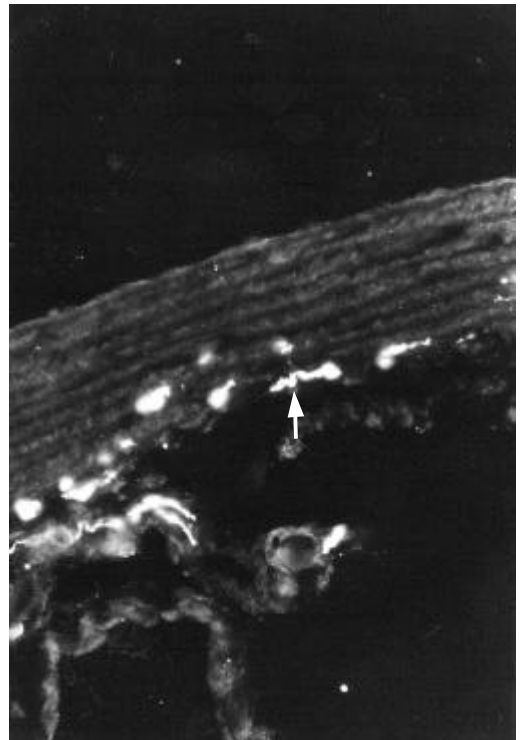
a) Truncus pulmonalis, NOS (x40)



b) Truncus pulmonalis, NPY (x40)



c) Pulmonalarterie, NOS (x40)

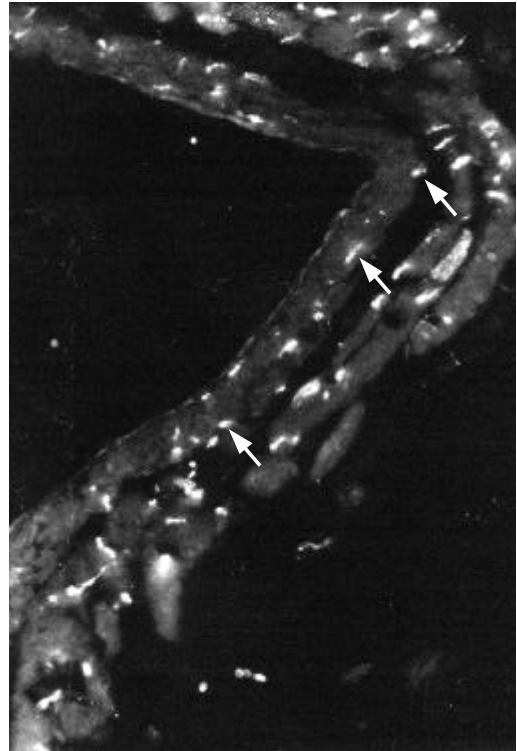


d) Pulmonalarterie, NPY (x40)

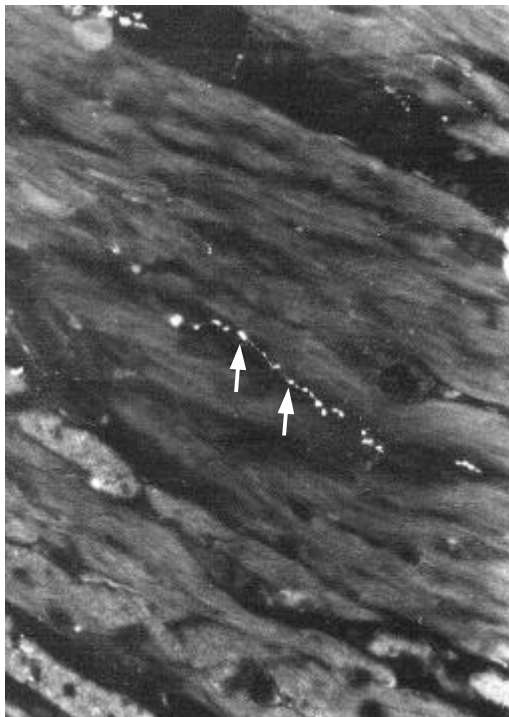
**Abb. 15:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung eines Truncus pulmonalis- (a,b) und eines extrapulmonalen Lungenarterienanschnittes (c,d). Beide Anschnitte zeigen zahlreiche NPY-immunreaktive (a,c) Nervenfasern. Neben wenigen nur NOS-immunreaktiven Fasern zeigen einige, wie hier dargestellt, Immunreaktivität für NOS (a,c) und NPY (b,d) (Pfeile).



a) Pulmonalvene, NOS (x40)



b) Pulmonalvene, NPY (x40)

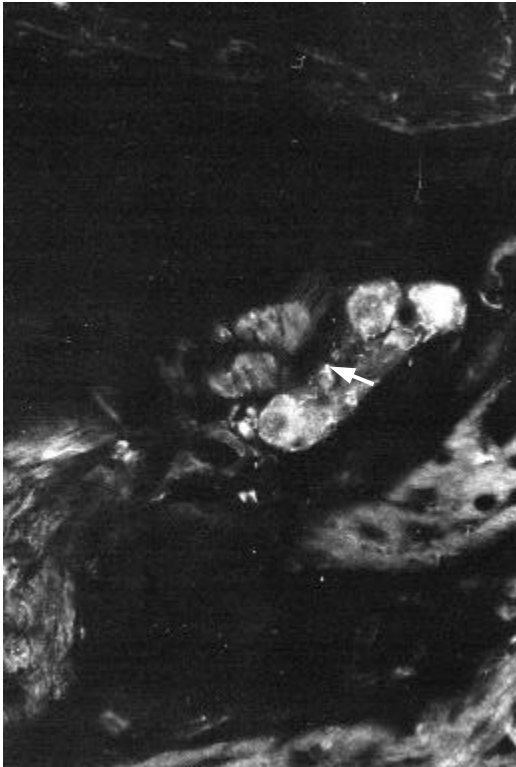


c) Myokard, NOS (x40)

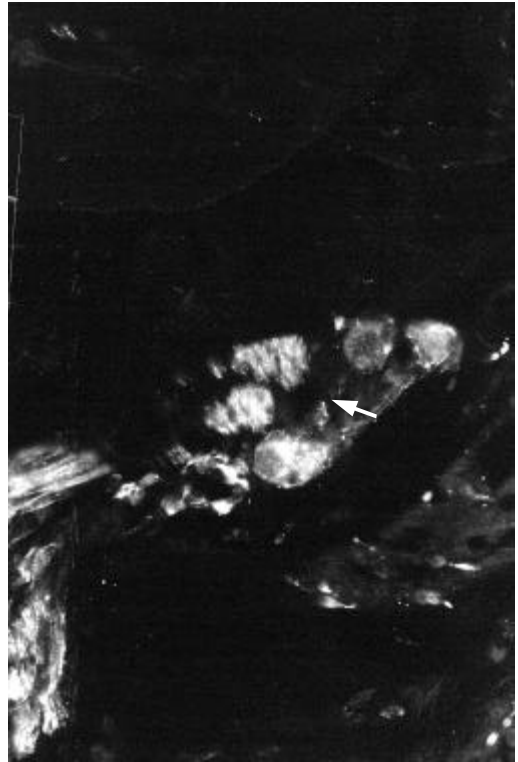


d) Myokard, NPY (x40)

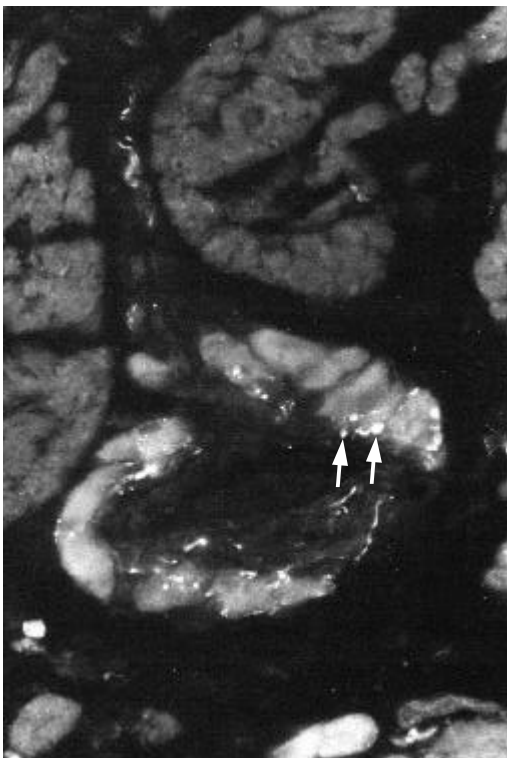
**Abb. 16:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung eines Pulmonalvenen- (a,b) und eines Myokardanschnittes (c,d). Sowohl in herznahen Lungenvenen (obere Reihe) als auch in der Herzmuskulatur (untere Reihe) lässt sich ein dichtes Netz NPY-immunreaktiver (b,d) Nervenfasern darstellen. Neben wenigen nur NOS-immunreaktiven Fasern gibt es etliche, die sowohl für NOS (a,c), als auch für NPY (b,d) immunreaktiv sind (Pfeile).



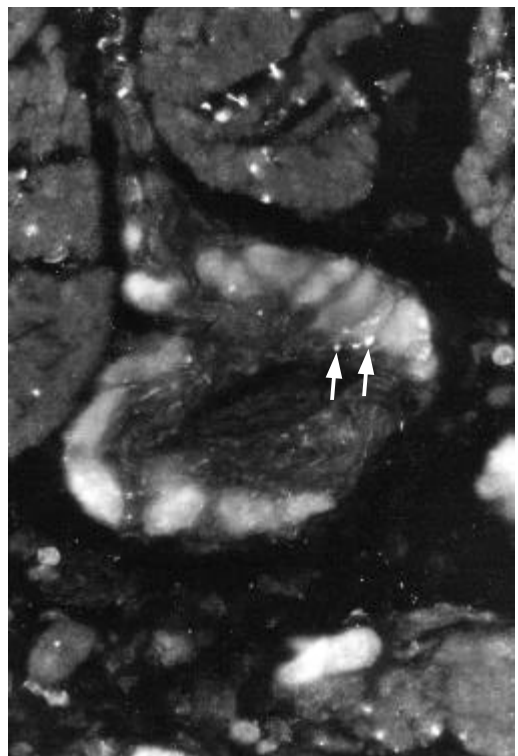
a) Herzganglion, NOS (x40)



b) Herzganglion, NPY (x40)

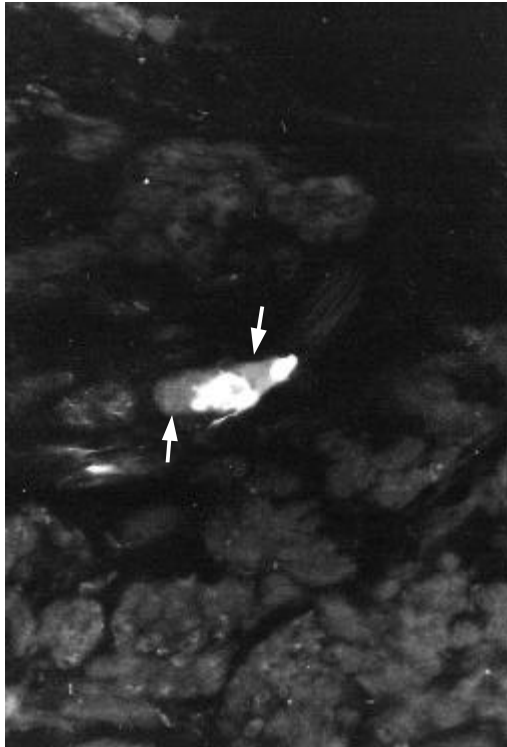


c) Herzganglion, NOS (x40)

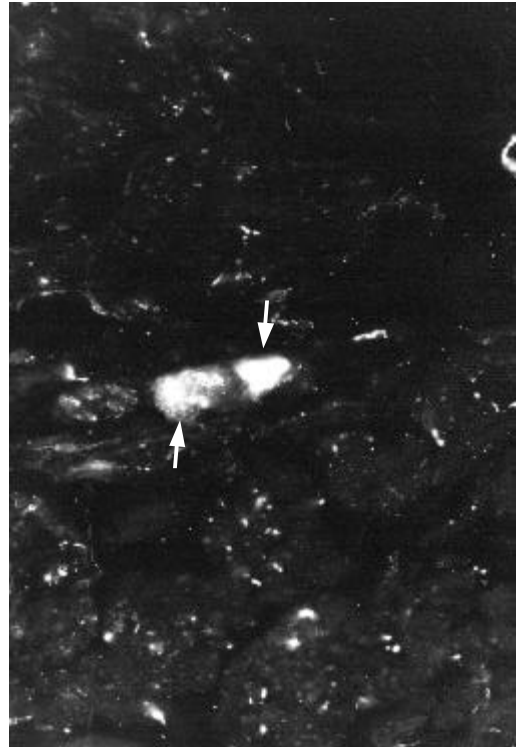


d) Herzganglion, NPY (x40)

**Abb. 17:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung zweier Herzganglionanschnitte (a,b sowie c,d). In zahlreichen Faserkörben, die die Herzneurone umspinnen, lassen sich NOS (a,c) und NPY (b,d) kolokalisiert darstellen (Pfeile).



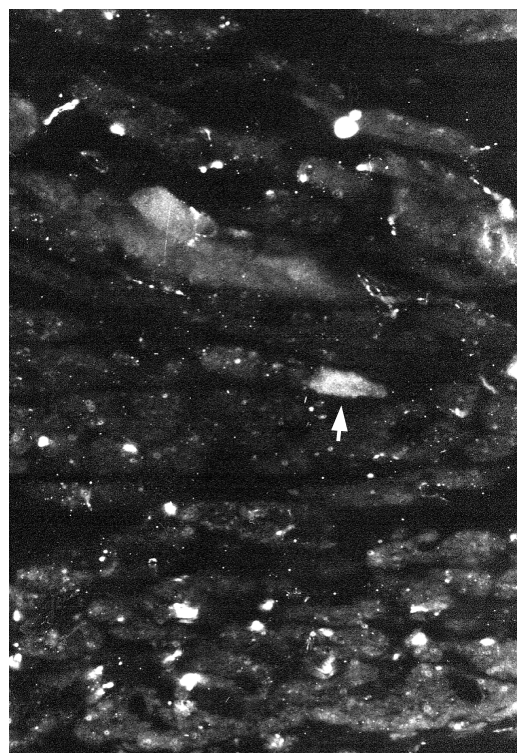
a) Herzganglion, NOS (x40)



b) Herzganglion, NPY (x40)



c) Herzganglion, NOS (x40)



d) Herzganglion, NPY (x40)

**Abb. 18:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung zweier Herzganglionanschnitte (a,b sowie c,d). In intrinsischen Ganglienzellen des Herzens können NOS (a) und NPY (b) entweder getrennt voneinander (Pfeile) oder kolokalisiert im gleichen Nervenzellkörper (c,d) (kleine Pfeile) dargestellt werden.

### 3.2.5 NOS und VIP

In den Atemwegen waren NOS- und VIP-immunreaktive Fasern bevorzugt in der Muskulatur von Trachea und großen Bronchien dazustellen. Neben Fasern mit NOS- und Fasern mit VIP-Immunreaktivität zeigte sich häufig eine Kolokalisation von NOS und VIP in den gleichen Nervenfasern (Abb. 19).

Die lokalen Atemwegsneurone waren weder für NOS noch für VIP immunreaktiv. Die Pulmonalarterien wurden regelmäßig durch NOS- sowie durch VIP-immunreaktive Fasern innerviert. Sowohl die Zahl der NOS- als auch die Zahl der VIP-immunreaktiven Fasern war in den großkalibrigen Pulmonalarterienabschnitten am größten und nahm zur Lungenperipherie hin ab. Entlang der gesamten Pulmonalarterie zeigte sich häufig eine Koexistenz von NOS und VIP in den gleichen Nervenfasern (Abb. 20).

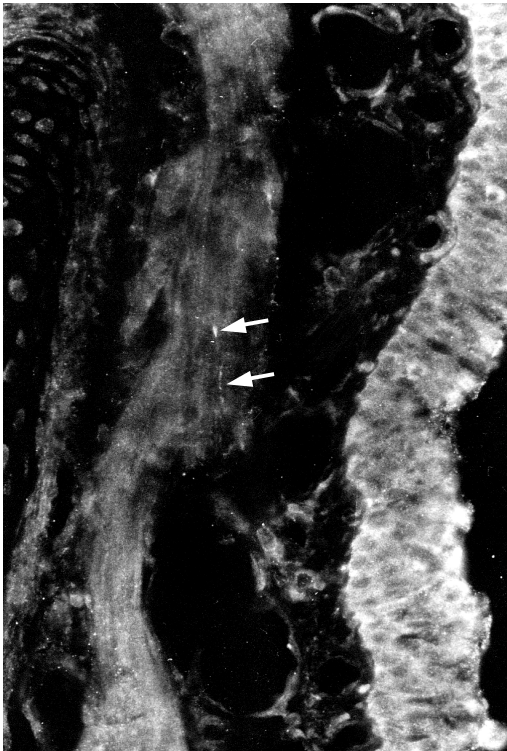
Die Pulmonalvenen waren nur in ihren herznahen Abschnitten regelmäßig durch NOS-immunreaktive und in geringerem Maße durch VIP-immunreaktive Nervenfasern innerviert. Neben Fasern, die nur NOS-immunreaktiv waren, und Fasern, in denen nur VIP-Immunreaktivität darstellbar war, waren NOS und VIP in einigen Fällen kolokalisiert (Abb. 21).

Die Herzmuskulatur zeigte eine relativ geringe Innervation durch NOS- und eine noch seltenere Innervation durch VIP-immunreaktive Fasern. Beide Nervenfasertypen waren bevorzugt im subepikardialen Vorhofmyokard und Reizleitungssystem lokalisiert. Hier konnten relativ häufig Fasern dargestellt werden, die sowohl Immunreaktivität für NOS als auch für VIP aufwiesen (Abb. 21).

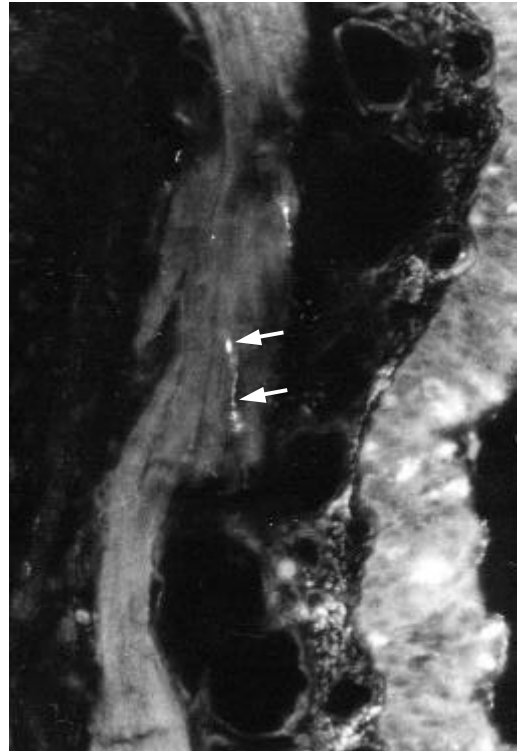
Die intrinsischen Ganglienzellen des Herzens zeigten teilweise NOS-Immunreaktivität, waren jedoch nie immunreaktiv für VIP (Abb. 22).

In den kardialen Ganglien waren die die Herzneurone umspinnenden Faserkörben häufig sowohl für NOS als auch für VIP immunreaktiv (Abb. 22).

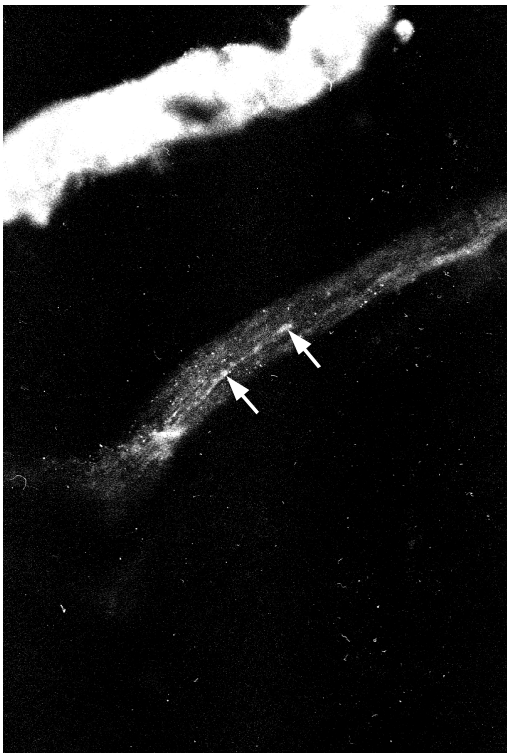




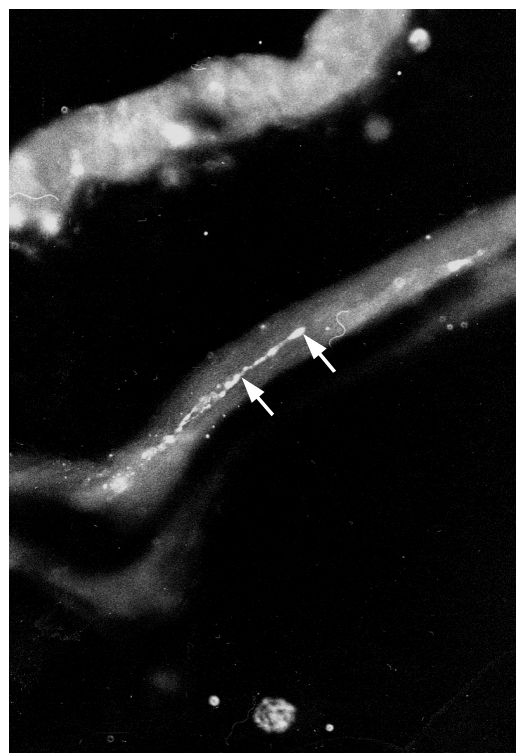
a) Hauptbronchus, NOS (x40)



b) Hauptbronchus, VIP (x40)

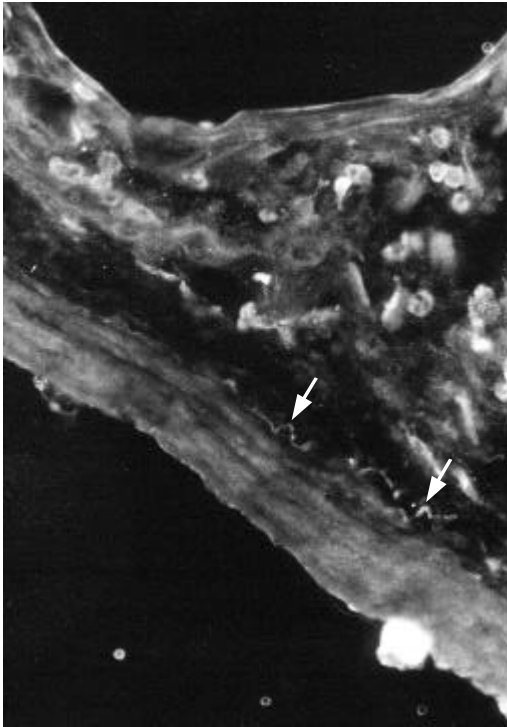


c) Hauptbronchus, NOS (x40)

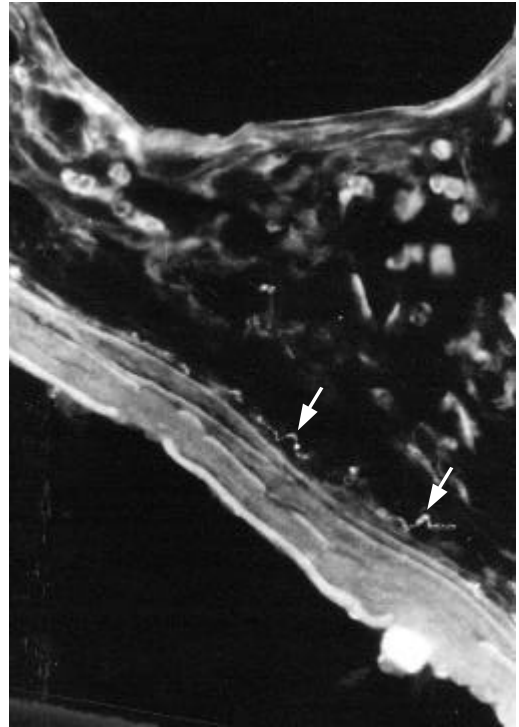


d) Hauptbronchus, VIP (x40)

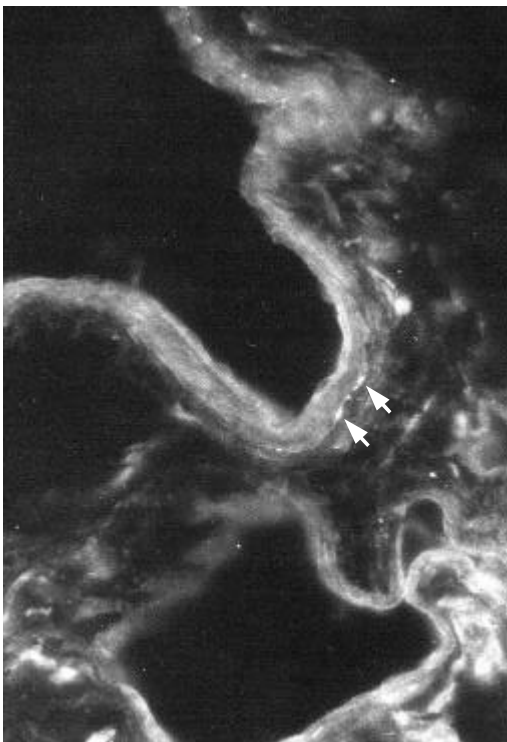
**Abb. 19:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung zweier Hauptbronchusanschnitte (a,b sowie c,d). Gemeinsame Darstellung von NOS- (a,c) und VIP-Immunreaktivität (b,d) in Fasern in der Muskulatur großer Bronchien (Pfeile).



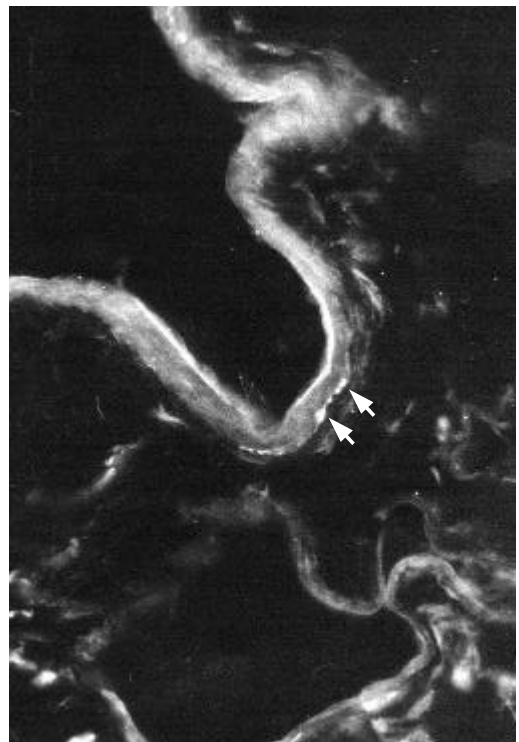
a) Pulmonalarterie, NOS (x40)



b) Pulmonalarterie, VIP (x40)

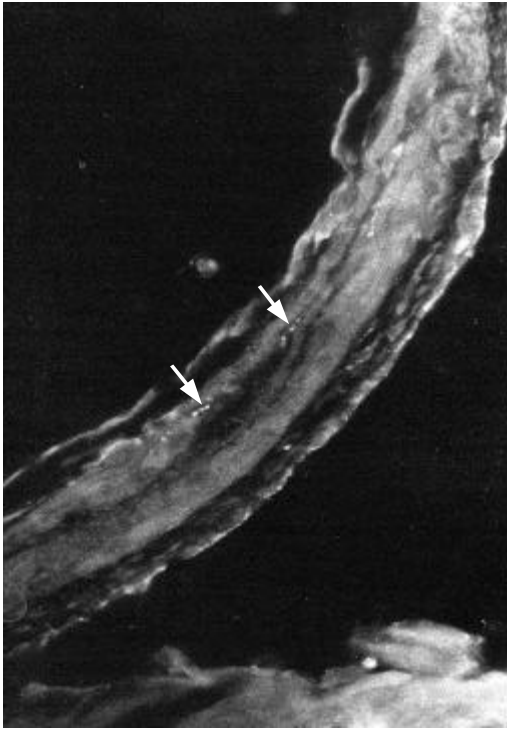


c) Pulmonalarterie, NOS (x40)

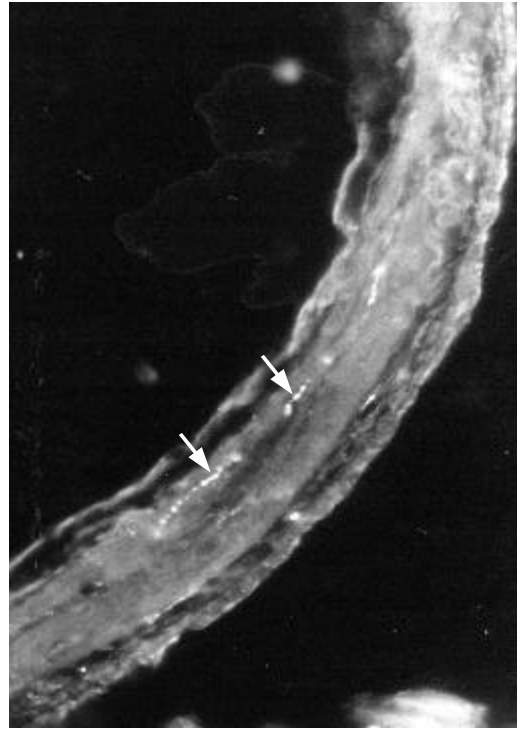


d) Pulmonalarterie, VIP (x40)

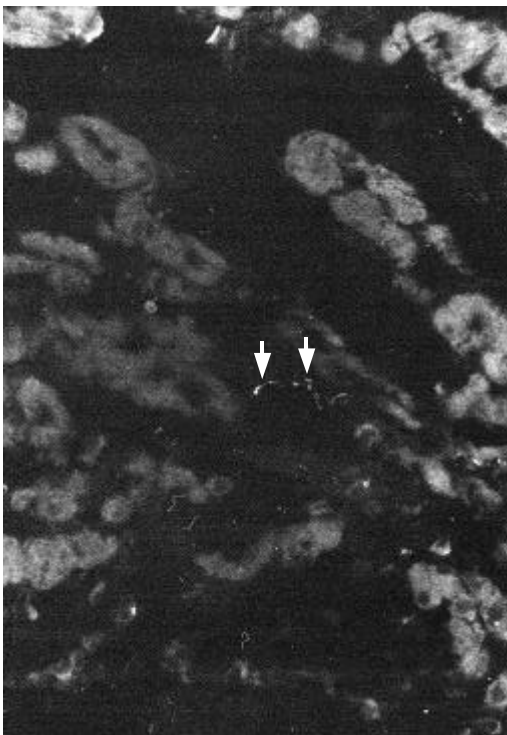
**Abb. 20:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung zweier Pulmonalarterienanschnitte (a,b sowie c,d). Der Anschnitt einer großen, extrapulmonalen Lungenarterie zeigt eine langgestreckte Nervenfasern mit Immunreaktivität für NOS (a) und VIP (b) (Pfeile). Auch intrapulmonal zeigen Lungenarterien regelmäßig gemeinsame Immunreaktivität für NOS (c) und VIP (d) (kleine Pfeile).



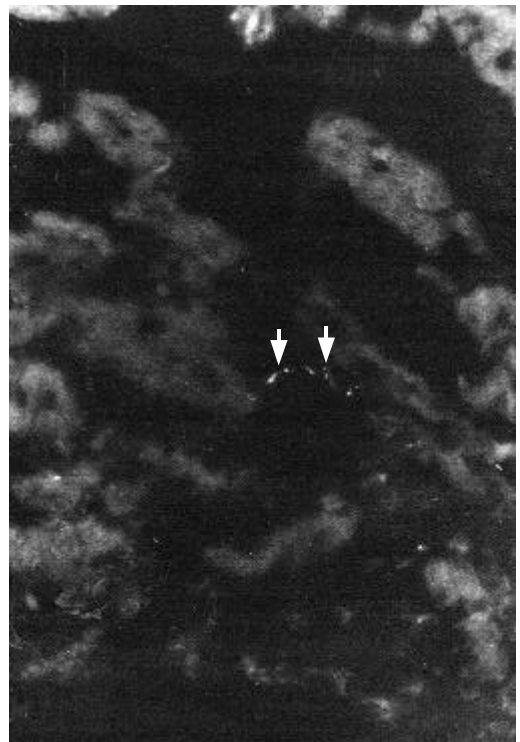
a) Pulmonalvene, NOS (x40)



b) Pulmonalvene, VIP (x40)



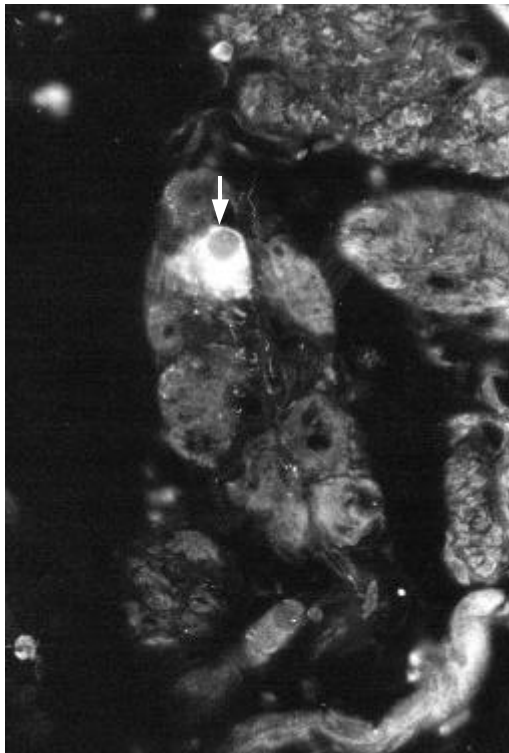
c) Myokard, NOS (x40)



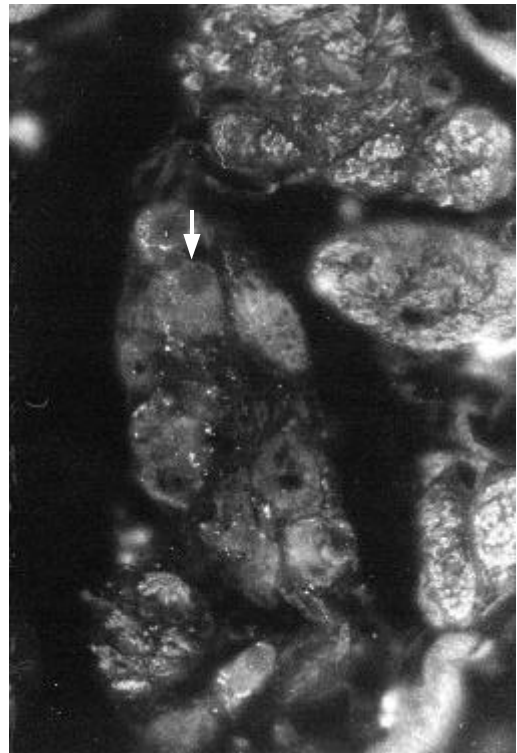
d) Myokard, VIP (x40)

**Abb. 21:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung eines Lungenvenen- (a,b) und eines Myokardanschnittes (c,d). Darstellung NOS- (a) und VIP-immunreaktiver (b) Fasern im Anschnitt einer herznahen Lungenvene (Pfeile). Auch in Fasern, die die Herzmuskulatur innervieren, lassen sich NOS (c) und VIP (d) gemeinsam darstellen (kleine Pfeile).

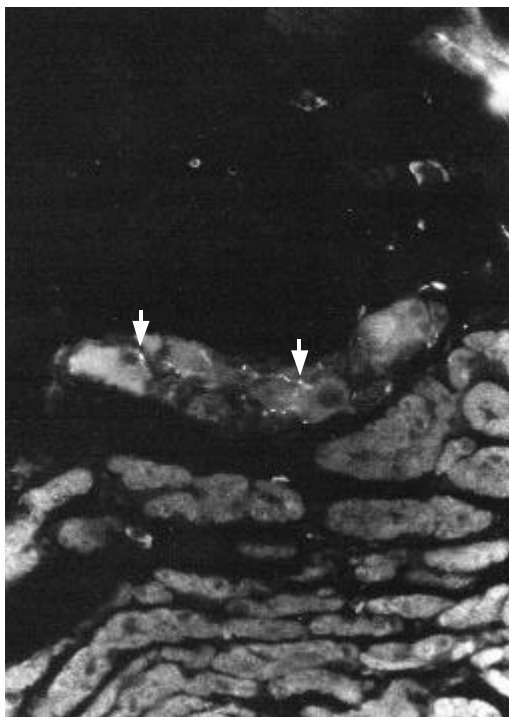




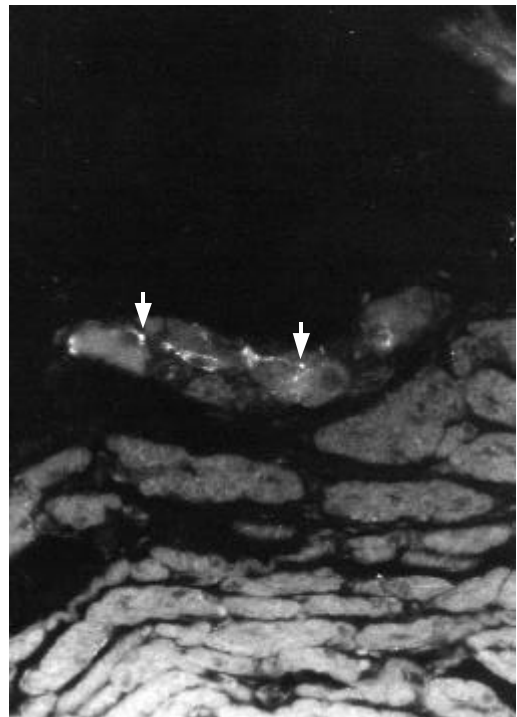
a) Herzganglion, NOS (x40)



b) Herzganglion, VIP (x40)



c) Herzganglion, NOS (x40)



d) Herzganglion, VIP (x40)

**Abb. 22:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung zweier Herzganglionanschnitte (a,b sowie c,d). Während einzelne intrinsische Herzneurone Immunreaktivität für NOS (c) zeigen (Pfeile), lässt sich VIP-Immunreaktivität (d) nur in Nervenfaserschnitten darstellen. In Faserkörben, die die Herzneurone umspinnen, lassen sich NOS (c) und VIP (d) oft kolokalisieren (kleine Pfeile).

### 3.2.6 NPY und VIP

NPY-immunreaktive Fasern waren in den Atemwegen in Adventitia, Muskularis und Submukosa zahlreich vertreten. VIP-immunreaktive Fasern kamen vor allem in der glatten Muskulatur von Trachea und Bronchien vor. Häufig zeigte sich eine Kolokalisation von NPY und VIP in Nervenfasern der glatten Muskulatur. Daneben gab es aber auch wenige nur VIP- und etliche nur NPY-immunreaktive Fasern (Abb. 23).

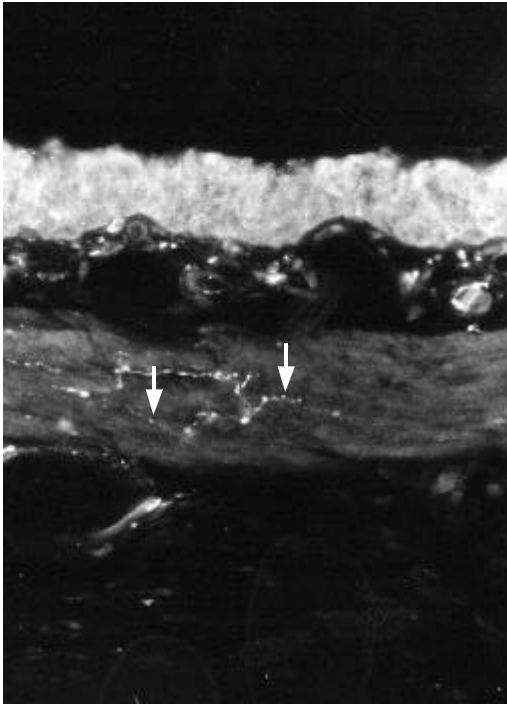
Die intrinsischen Atemwegsneurone waren weder für NPY noch für VIP immunreaktiv.

Die Pulmonalarterien wurden von ihrem Ursprung an bis in die Lungenperipherie hinein durch zahlreiche NPY-immunreaktive Nervenfasern innerviert. VIP-immunreaktive Fasern waren regelmäßig, aber deutlich seltener anzutreffen. Ihre Zahl war in den proximalen, großkalibrigen Pulmonalarterienabschnitten relativ hoch, während sie in den peripheren, kleinkalibrigen Abschnitten seltener vorkamen. Neben vielen Fasern, die nur NPY-Immunreaktivität zeigten, und einigen nur VIP-immunreaktiven Fasern, waren NPY und VIP in etlichen Nervenfasern kolokalisiert (Abb. 24).

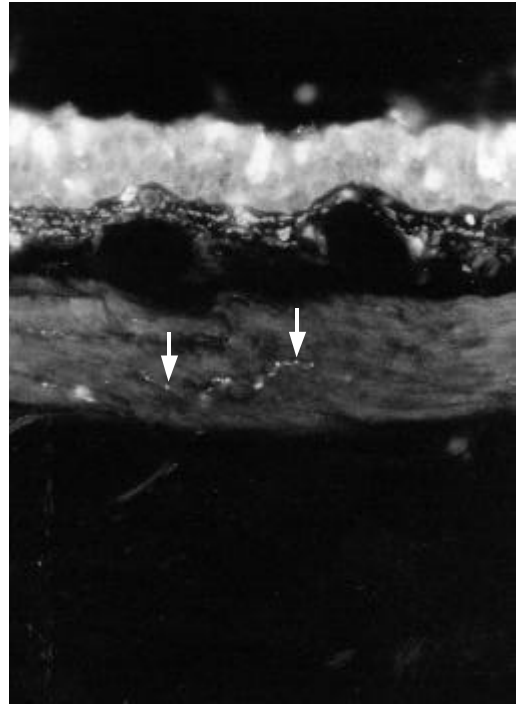
Die Lungenvenen zeigten von ihrer Mündung bis in die Lungenperipherie hinein zahlreiche NPY-immunreaktive Nervenfasern, während VIP-immunreaktive Fasern nur in den herznahen Pulmonalvenenabschnitten darstellbar waren. Auch in diesen herznahen Pulmonalvenenabschnitten gab es Fasern, die Immunreaktivität für beide Antigene zeigten (Abb. 24).

Die Herzmuskulatur zeigte sowohl auf Vorhof- als auch auf Ventrikel Ebene eine dichte, netzartige Innervation durch NPY-immunreaktive Fasern. VIP-immunreaktive Fasern waren vergleichsweise selten und bevorzugt in subepikardialen Myokardbereichen anzutreffen. Kolokalisationen von NPY und VIP ließen sich in solchen subepikardial gelegenen Nervenfasern häufig darstellen (Abb. 25).

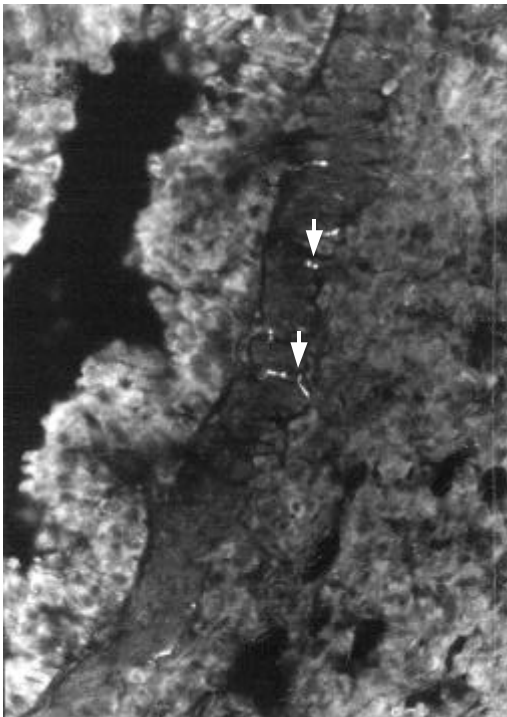
Intrinsische Herzneurone waren teilweise NPY-immunreaktiv, zeigten jedoch nie Immunreaktivität für VIP. In einigen kardialen Ganglien ließen sich in den die Herzneurone umspinnenden Faserkörben NPY und VIP kolokalisieren (Abb. 25).



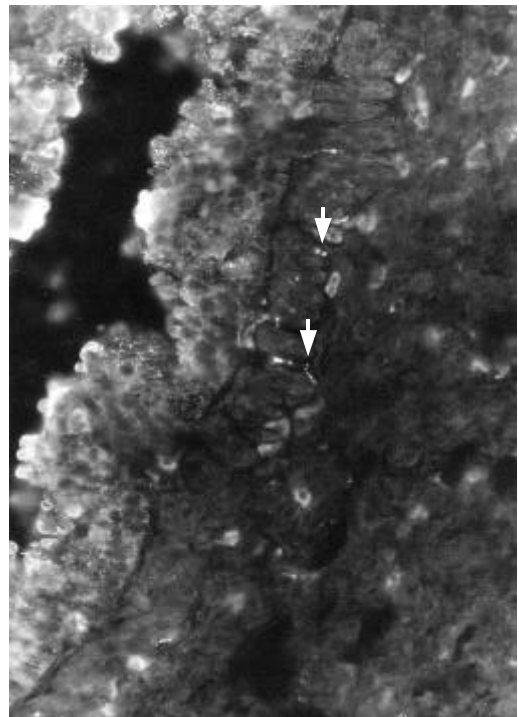
a) Hauptbronchus, NPY (x40)



b) Hauptbronchus, VIP (x40)



c) Bronchiolus, NPY (x40)



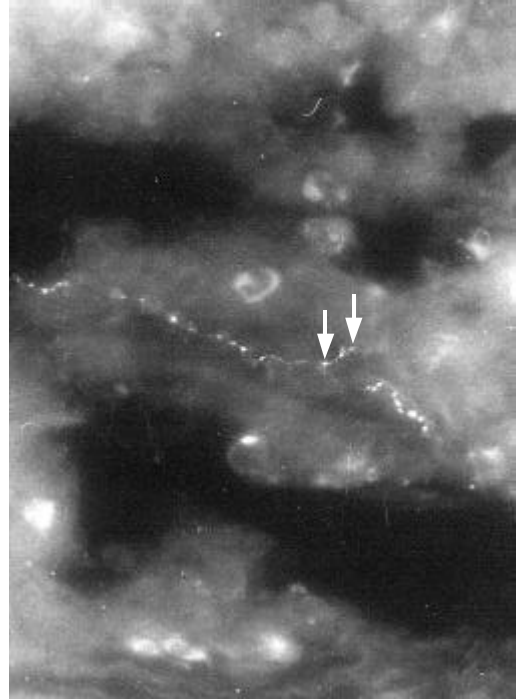
d) Bronchiolus, VIP (x40)

**Abb. 23:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung eines Hauptbronchus- (a,b) und eines Bronchiolusanschnittes (c,d). Neben nur NPY-immunreaktiven Fasern in Adventitia, Muskularis und Submukosa zeigen einige Fasern in der Muskularis des Hauptbronchus Immunreaktivität für beide Neuropeptide (Pfeile).

Gemeinsame Darstellung von NPY (c) und VIP (d) in Nervenfasern der glatten Bronchiolus-Muskulatur (kleine Pfeile).



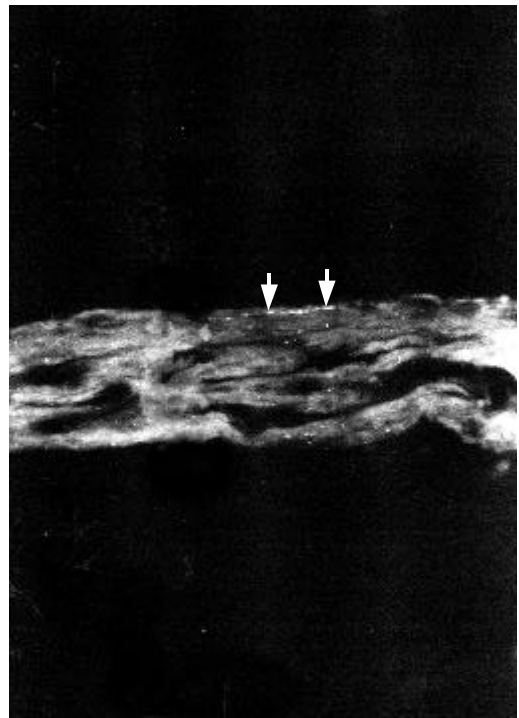
a) Pulmonalarterie, NPY (x40)



b) Pulmonalarterie, VIP (x40)

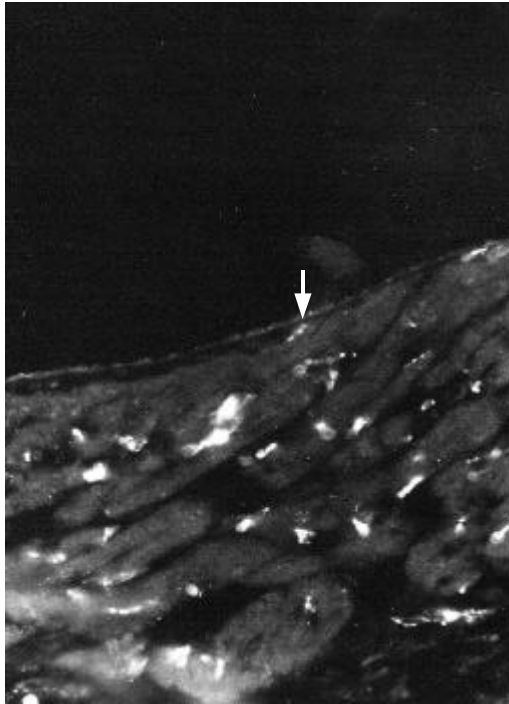


c) Pulmonalvene, NPY (x40)

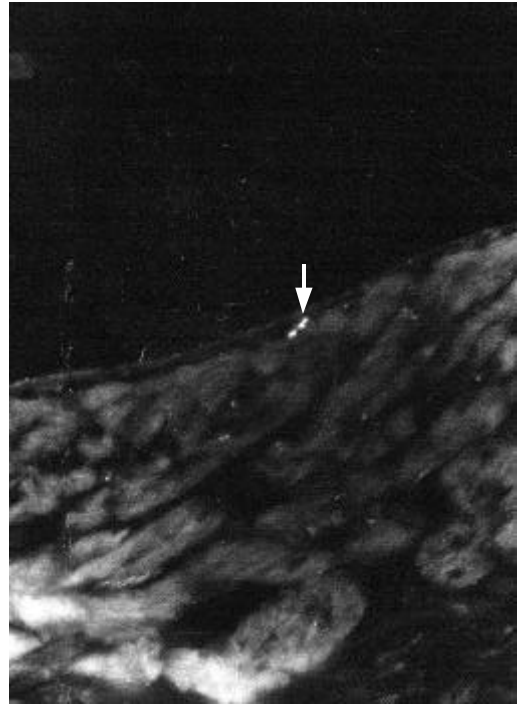


d) Pulmonalvene, VIP (x40)

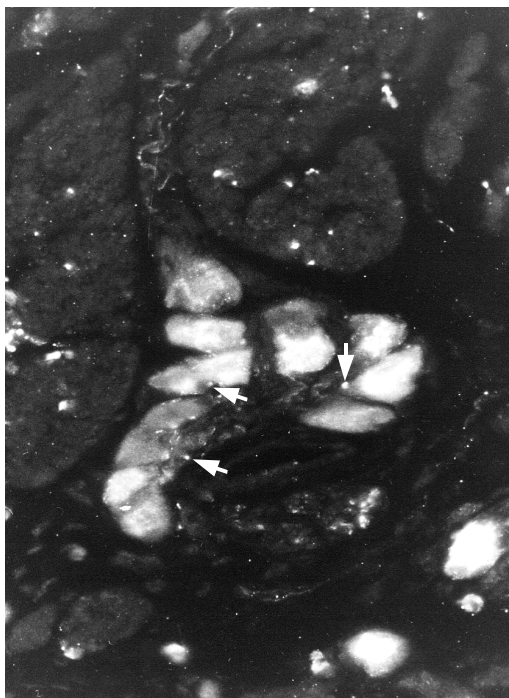
**Abb. 24:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung eines Pulmonalarterien- (a,b) und eines Pulmonalvenenanschnittes (c,d). Der Anschnitt der intrapulmonalen Arterie zeigt zahlreiche NPY-immunreaktive (a) Fasern, von denen eine ebenfalls Immunreaktivität für VIP (b) aufweist (Pfeile). Die herznahe Lungenvene ist von einem Netz NPY-immunreaktiver (c) Nervenfasern durchzogen, von denen einzelne zusätzlich VIP-Immunreaktivität (d) zeigen (kleine Pfeile).



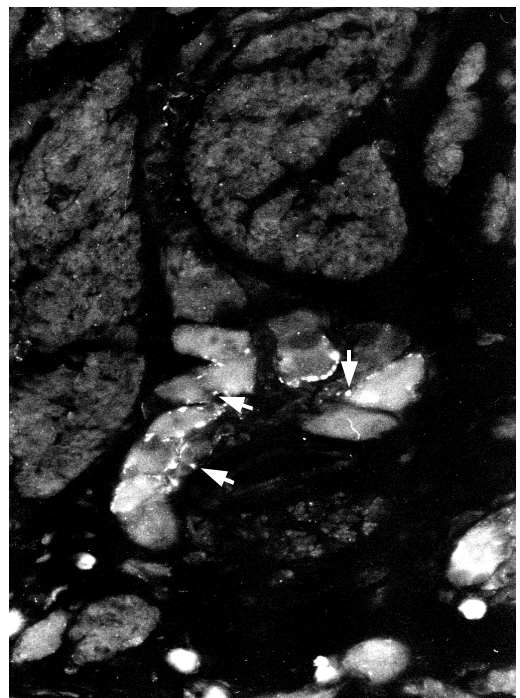
a) Myokard, NPY (x40)



b) Myokard, VIP (x40)



c) Herzganglion, NPY (x40)



d) Herzganglion, VIP (x40)

**Abb. 25:** Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung eines Myokard- (a,b) und eines Herzganglionanschnittes (c,d). An der Innervation des Herzmuskels sind zahlreiche NPY-immunreaktive (a) Nervenfasern beteiligt, von denen einzelne zusätzlich VIP-Immunreaktivität (b) aufweisen (Pfeile).

Intrinsische Herzneurone sind teilweise NPY-immunreaktiv (c), zeigen jedoch keine VIP-Immunreaktivität (d). In einigen Faserkörben, die die Herzneurone umspinnen, sind NPY (c) und VIP (d) gemeinsam darstellbar (kleine Pfeile).

## **4 Diskussion**

### **4.1 Methoden**

Prinzipiell stellen Doppelimmunfluoreszenz-Studien eine verlässliche Methode zum Nachweis von Koloalisationen verschiedener Transmittersubstanzen in Nervenfasern und Nervenzellkörpern dar (Wessendorf et Elde 1985). Es muss jedoch betont werden, dass es hierbei zu falsch-negativen Interpretationen kommen kann, wenn, wie im vorliegenden Fall, die untersuchten Antigene in verschiedenen Kompartimenten des jeweiligen Neurons lokalisiert sind.

Sowohl die Enzyme ChAT und NOS als auch die Neuropeptide NPY und VIP werden an Ribosomen im Zellkörper der Nervenzelle synthetisiert. Nach der Synthese werden NPY und VIP im Golgi-Apparat in große, granulierte Vesikel verpackt und per axonalem Transport in die terminalen Varikositäten transportiert (Lundberg 1981), wo sie zunächst gespeichert und dann durch Exozytose freigesetzt werden (Fujita et al. 1988). ChAT und NOS werden nach ihrer Synthese in das Axoplasma abgegeben, um hier ACh und NO zu synthetisieren (Bredt et al. 1990, Kummer et Mayer 1993). Alle vier Antigene lassen sich demnach im Zellkörper der Neurone immunhistologisch nachweisen. Im weiteren Verlauf des Axons findet man NPY- und VIP-Immunreaktivität nur noch dort, wo sich deren Vesikel befinden, während ChAT und NOS nur im Axoplasma, also außerhalb der Vesikel, markiert werden können. Dies erklärt, warum in präterminalen Abschnitten eine immunhistologische Darstellung von NPY und VIP schwieriger ist, während ChAT und NOS in den terminalen Varikositäten in geringerer Dichte nachzuweisen sind. In der vorliegenden Studie wurden vor allem variköse Axonanteile zur Beurteilung von Antigenkoloalisationen herangezogen. Falsch-negative Interpretationen von fehlender Koexistenz von Neuropeptid- und Enzymimmunreaktivität durch Markierung unterschiedlicher axonaler Kompartimente wurden so weitestgehend ausgeschlossen.

## **4.2 Die autonome Innervation der Atemwege**

### **4.2.1 Die Innervation der Atemwege durch ChAT-immunreaktive Nervenfasern**

Die Innervation der Atemwege des Meerschweinchens durch ChAT-immunreaktive Nervenfasern war bereits aus früheren Studien bekannt (Fischer et al. 1996, Canning et Fischer 1997). In der vorliegenden Untersuchung konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. ChAT-immunreaktive Fasern waren vor allem in der gesamten Atemwegsmuskulatur von der Trachea bis zu den kleinen Bronchiolen zu finden. Vergleichsweise selten ließen sie sich in der Tunica submucosa und der Lamina adventitia der extrapulmonalen Atemwege nachweisen.

In elektrophysiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Stimulation cholinerg Nervenfasern eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur hervorruft (Yang et Biggs 1991). Diese durch Nervenstimulation bedingte Atemwegskonstriktion war von einer Unterbrechung extrinsischer Nervenfasern unabhängig. Auch nach viertägiger Organkultur, die zur Degeneration extrinsischer Axone führte, antworteten Tracheen auf elektrische Feldstimulation mit einer cholinerg vermittelten Muskelkontraktion (Canning et Udem 1993). Immunhistologische Untersuchungen ergaben, dass es in Tracheal- und Bronchialgewebe auch nach mehrtägiger Organkultur nicht zu einer Degeneration ChAT-immunreaktiver Nervenfasern kam, während Fasern, deren Perikaria außerhalb des untersuchten Gewebes gelegen hatten, bereits nach kurzer Zeit nicht mehr nachzuweisen waren.

Diese Beobachtungen und die genannten anatomischen Verhältnisse lassen erkennen, dass die cholinergen Fasern der Atemwege offensichtlich den lokalen Atemwegsneuronen entstammen, die vor allem entlang der extrapulmonalen Bronchien und Lungenhili zu finden sind (Fischer et al. 1996, Canning et Fischer 1997). Keines dieser Atemwegsneurone zeigte in der vorliegenden Untersuchung Immunreaktivität für NOS, NPY oder VIP und auch in Nervenfasern, die die Atemwege innervieren, war ChAT nur in Ausnahmefällen mit einem der genannten Antigene kolokalisiert. ACh wird also getrennt von NO, NPY und VIP aus postganglionären parasympathischen Nervenendigungen ausgeschüttet, um vor allem auf den Kontraktionszustand der glatten Atemwegsmuskulatur Einfluss zu nehmen. Über verschiedene muskarinerge Rezeptoren kann ACh unterschiedliche physiologische

Wirkungen entfalten. Durch seine direkte Wirkung auf muskuläre M3-Rezeptoren (Minette et Barnes 1990, Morrison et Vanhoutte 1992, Preuss et Goldie 1999) führt ACh zu seiner wohl wichtigsten Wirkung, einer Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur. M2-Rezeptoren auf cholinergen Nervenendigungen fungieren als Autorezeptoren, über die ACh seine eigene Ausschüttung regulieren kann (Minette et Barnes 1990, Doelman et al. 1991, Yang et Biggs 1991). M1-Rezeptoren auf parasympathischen Ganglienzellen scheinen eine ganglionäre Signalübertragung zu erleichtern (Yang et Biggs 1991). Eine weitere Möglichkeit, Einfluss auf den Kontraktionszustand der Atemwege zu nehmen, ergibt sich durch präsynaptische M2- und M3-Rezeptoren auf postganglionären sympathischen Nervenendigungen (Pendry et MacLagan 1991, Racke et al. 1992). ACh hat hier einen inhibitorischen Einfluss auf die durch sympathische Nervenstimulation induzierte Relaxation der Atemwegsmuskulatur.

#### 4.2.2 Die Innervation der Atemwege durch NOS-immunreaktive Nervenfasern

NOS-immunreaktive Nervenfasern waren den Ergebnissen früherer Untersuchungen (Fischer et al. 1993, 1996) entsprechend vor allem in der glatten Muskulatur der extra- und weniger häufig der intrapulmonalen Atemwege darzustellen. Oft zeigte sich in den NOS-immunreaktiven Nervenfasern zusätzlich NPY- oder VIP-Immunreaktivität. Kaum eine der NOS-immunreaktiven Fasern zeigte jedoch zusätzlich ChAT-Immunreaktivität (Fischer et al. 1996). Da sowohl die lokalen NOS-negativen Atemwegsneurone (Bowden et Gibbins 1992, Fischer et al. 1993, Canning et Fischer 1997), als auch die Herz- und Lungenvenen-Neurone allesamt ChAT-immunreaktiv waren, kommen sie als Ursprungsneurone der ChAT-negativen NOS-immunreaktiven Fasern nicht in Frage. Ursprungsneurone NOS-immunreaktiver Nervenfasern konnten durch retrograde Tracingexperimente in sympathischen und in sensiblen vagalen Ganglien dargestellt werden (Fischer et al. 1996). Hierzu wurde ein spezieller Tracingfarbstoff in die Trachealwand lebender Meerschweinchen injiziert. Nach Aufnahme des Farbstoffes durch lokale Nervenfasern wurde der Farbstoff durch retrograde axonale Transportmechanismen zu den entsprechenden Nervenzellkörper transportiert, wo er sich einige Tage später mikroskopisch nachweisen ließ. Sympathische Ursprungsneurone wurden so im Ganglion



stellatum und im Ganglion cervicale superius, sensible vagale Ursprungsneurone im Ganglion nodosum und im Ganglion jugulare markiert. Etwa 3 % der sympathischen Neurone, deren Fasern zur Trachea projizieren, waren NOS-immunreaktiv. Gleichzeitig waren sie nicht immunreaktiv für TH, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Katecholaminsynthese. Inwieweit diese nichtadrenergen NOS-immunreaktiven Neurone auch andere Neurotransmitter synthetisieren, und ob sie der Ursprung von Fasern sind, die neben NO auch NPY oder VIP ausschütten, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Man weiß jedoch von NOS-immunreaktiven Neuronen des Ganglion stellatum und des Ganglion cervicale superius, die potentiell mit den markierten Nervenzellen übereinstimmen könnten, dass sie zu 25% (Ganglion stellatum) bzw. zu 13% (Ganglion cervicale superius) NPY-Immunreaktivität aufweisen (Höhler et al. 1995). Außerdem synthetisieren 26% der NOS-immunreaktiven Stellatumneurone und 6% der NOS-immunreaktiven Ganglion cervicale superius-Neurone VIP (Höhler et al. 1995). Eine Verknüpfung dieser Einzelergebnisse lässt vermuten, dass zumindest ein Teil der NOS/NPY- bzw. der NOS/VIP-immunreaktiven Fasern der Atemwege sympathischen Ursprungs sind.

Von den retrograd markierten Neuronen des Ganglion nodosum waren etwa 5-10%, von denen des Ganglion jugulare etwa 10-20% NOS-immunreaktiv. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß diese sensiblen, vagalen Atemwegsneurone neben NOS-, auch NPY und VIP-Immunreaktivität zeigen (Fischer et al. 1996).

Einen weiteren Ursprung NOS-haltiger Fasern stellen Neurone innerhalb des myenterischen Plexus des Oesophagus dar. Erste Indizien, die für die Existenz dieser Neurone sprachen, ergaben sich aus elektrophysiologischen Experimenten. Nach zweitägiger Organkultur, die extrinsische Fasern degenerieren ließ, antworteten Tracheen auf elektrische Feldstimulation mit einer nichtadrenergen-nichtcholinergen Muskelrelaxation. Diese war jedoch nur dann auslösbar, wenn zuvor der Oesophagus nicht entfernt worden war (Canning et al. 1993). Durch retrograde Tracingexperiment konnten dann NOS-, NPY- und VIP-immunreaktive Neurone im Plexus myentericus des Ösophagus dargestellt werden, deren Fasern in die glatte Atemwegsmuskulatur projizieren (Fischer et al. 1998, Moffatt et al. 1998).

NO bewirkt eine Relaxation der glatten Atemwegsmuskulatur (Lei et al. 1993, Venugopalan et al. 1998). NO aktiviert die glattemuskuläre Guanylatzyklase und führt so zu einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration (Waldman et al. 1987, Bush et al. 1992).

Zyklisches GMP aktiviert wiederum spezifische cGMP-abhängige Proteinkinasen, die in der Lage sind den Tonus der Atemwegsmuskulatur zu vermindern. NO inhibiert zusätzlich die ACh-Freisetzung aus postsynaptischen cholinergen Nervenendigungen (Belvisi et al. 1991, 1993) und hat so neben seinem direkt relaxierenden einen indirekt relaxierenden Effekt auf die Tracheobronchialmuskulatur.

#### 4.2.3 Die Innervation der Atemwege durch NPY-immunreaktive Nervenfasern

NPY-immunreaktive Nervenfasern ließen sich entsprechend den Ergebnissen früherer Studien (Bowden et Gibbins 1992, Kummer et al. 1992) sowohl in der gesamten Atemwegsmuskulatur als auch in der Lamina adventitia und der Tunica submucosa darstellen. In den adventitiellen NPY-Fasern, die hier bevorzugt Blutgefäße innervierten, ließen sich außer NPY auch TH und Dynorphin nachweisen (Kummer et al. 1992). Fasern in der glatten Muskulatur und der Submukosa waren häufig NPY- und TH-immunreaktiv (Kummer et al. 1992). Offensichtlich waren beide Nervenfasertypen postganglionäre Fasern sympathischen Ursprungs. Neben diesen NPY- und TH-immunreaktiven Nervenfasern gab es in der Atemwegsmuskulatur etliche nichtadrenerge Fasern, die neben NPY- auch VIP-Immunreaktivität aufwiesen (Bowden et Gibbins 1992, Kummer et al. 1992). Die vorliegende Untersuchung zeigte außerdem zahlreiche Fasern, in denen NPY mit NOS kolokalisiert war.

Mögliche Ursprungsneurone NPY-immunreaktiver Fasern wurden in verschiedenen neuronalen Tracingstudien in sympathischen Ganglien identifiziert (Kummer et al. 1992, Bowden et Gibbins 1992). Sympathische Neurone, deren Fasern die Trachea innervierten, wurden im Ganglion stellatum und im Ganglion cervicale superius markiert. Über 96% dieser markierten Neurone zeigten Immunreaktivität für TH, und zwischen 59 und 84% zeigten Immunreaktivität für NPY. Auch Neurone, die NPY- und VIP-immunreaktiv waren, ließen sich auf diese Weise darstellen (Bowden et Gibbins 1992). Der Anteil der TH-negativen Neurone war mit weniger als 4% jedoch so gering, dass diese kaum der Ursprung sämtlicher nichtadrenerger, NPY- und VIP-immunreaktiver Atemwegsfasern sein können. Wahrscheinlicher ist es, dass ein Großteil der NOS-, NPY- und VIP-immunreaktiven Fasern Neuronen entstammt, die im Plexus myentericus des Oesophagus nachgewiesen wurden.

Diese Neurone synthetisieren NOS, VIP und NPY und sind für die nichtadrenerge-nichtcholinerge Atemwegsrelaxation von entscheidender Bedeutung (Canning et Undem 1993). NPY reguliert vor allem die Durchblutung des Tracheobronchialgewebes, indem es über eine arterielle und venöse Gefäßkonstriktion den Widerstand der Atemwegsgefäße erhöht (Franco-Cereceda et al. 1995). Sein Einfluss auf den Tonus der glatten Atemwegsmuskulatur ist vergleichsweise gering (Grundemar et al. 1988). Seine allenfalls gering ausgeprägte bronchokonstriktorische Wirkung, die sich auf eine sekundäre Prostaglandinsynthese zurückführen lässt (Cadieux et al. 1989, Taouidi Benchekroun et al. 1992), scheint unbedeutend zu sein. Gemeinsam mit VIP und NOS ausgeschüttet könnte NPY jedoch via Verminderung des lokalen Blutflusses deren Abtransport und so deren potentielle Wirkungsdauer verlängern. Weitere Einflussmöglichkeiten bestehen in der Stimulation präsynaptischer NPY-Rezeptoren auf postganglionären autonomen Nervenendigungen. NPY inhibiert hier die Ausschüttung sowohl bronchodilatatorischer als auch bronchokonstriktorischer Transmittersubstanzen (Grundemar et al. 1988, Stretton et Barnes 1988, Stretton et al. 1990, Taouidi Benchekroun et al. 1992).

#### 4.2.4 Die Innervation der Atemwege durch VIP-immunreaktive Nervenfasern

VIP-immunreaktive Nervenfasern ließen sich wie bereits in früheren Untersuchungen (Bowden et Gibbins 1992, Kummer et al. 1992, Fischer et al. 1996) vor allem in der glatten Muskulatur extrapulmonaler Atemwege finden. Seltener waren sie in der Muskularis intrapulmonaler Atemwege und vereinzelt in der Tunica submucosa darzustellen. Vor allem Fasern in der Atemwegsmuskulatur waren häufig außer für VIP auch für NOS oder NPY immunreaktiv. Auch hierin stimmen die Ergebnisse dieser Untersuchung mit denen früherer Studien überein (Bowden et Gibbins 1992, Kummer et al. 1992, Fischer et al. 1996). Dass jedoch alle VIP-immunreaktiven Atemwegsfasern auch Immunreaktivität für NPY zeigten (Bowden et Gibbins 1992), ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen. Intrinsische Nervenzellkörper entlang des Tracheobronchialstamms zeigten keine Immunreaktivität für VIP (Bowden et Gibbins 1992, Kummer et al. 1992, Fischer et al. 1993). Auch die intrinsischen Nervenzellkörper des Herzens und entlang der pulmonalen Venen waren allesamt VIP-negativ. Als

Ursprungsneurone der VIP-immunreaktiven Fasern kommen daher erneut die oben beschriebenen, retrograd markierten Sympathikus- und Oesophagusneurone in Frage (Bowden et Gibbins 1992, Kummer et al. 1992, Fischer et al. 1998, Moffatt et al. 1998). In ersteren wurde bereits sicher eine Kolo-kalisation von VIP- und NPY-Immunreaktivität (Bowden et Gibbins 1992) sowie von VIP- und NOS-Immunreaktivität gezeigt (Höhler et al. 1995). Ihre Zahl ist jedoch sicherlich zu gering, um die zahlreichen VIP-immunreaktiven Atemwegsfasern zu erklären. Neurone der myenterischen Ganglien des Ösophagus kommen aufgrund ihrer größeren Anzahl am ehesten in Betracht, denn sie wurden bereits als Ursprungsneurone NOS-, NPY- und VIP-immunreaktiver Fasern identifiziert (Fischer et al. 1998, Moffatt et al. 1998). VIP bewirkt an der glatten Atemwegsmuskulatur eine Verminderung des Muskeltonus (Hand et al. 1984, Lundberg et al. 1984, Saga et al. 1984, Palmer et al. 1986) via Stimulation postsynaptischer VIP-Rezeptoren (Carstairs et Barnes 1986). Durch G-Protein vermittelte Stimulation der Adenylatzylase kommt es über einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Atemwegsdilatation (Taton et al. 1982). Eine weitere Möglichkeit, Einfluss auf den Muskeltonus der Atemwege zu nehmen, besteht in der Stimulation präsynaptischer VIP-Rezeptoren auf postganglionären parasympathischen Nervenendigungen. Hierdurch kommt es zu einer verminderten ACh-Ausschüttung und so zu einer Verminderung der cholinergen Bronchokonstriktion (Belvisi et al. 1993, Shigyo et al. 1997).

#### 4.2.5 Zusammenfassende Darstellung der Systeme

Zusammenfassend lässt die autonome Innervation der Atemwege des Meerschweinchens eine anatomische und funktionelle Dreiteilung erkennen.

Zum einen gibt es den klassischen parasympathischen Anteil, dessen Hauptneurotransmitter ACh darstellt. Präganglionäre Fasern dieses Innervationsweges entstammen Neuronen des Nucleus ambiguus und ziehen mit dem Nervus vagus zu den intrinsischen Atemwegsganglien entlang der extrapulmonalen Bronchi und der Lungenhili. Hier werden sie synaptisch auf postganglionäre Neurone umgeschaltet, die ihrerseits das Tracheobronchialsystem cholinerg innervieren. Hauptziel dieser Fasern ist die glatte Atemwegsmuskulatur, wo ACh zu einer direkt vermittelten Muskelkontraktion führt. Über

präsynaptische Rezeptoren auf verschiedenen postganglionären Nervenendigungen nimmt ACh außerdem indirekt Einfluss auf den Tonus der glatten Atemwegsmuskulatur.

Den zweiten Teil stellt der klassische sympathische adrenerge Innervationsweg dar. Postganglionäre Fasern dieses Systems entstammen Neuronen der zervikalen und oberen thorakalen Grenzstrangganglien und haben neben NA häufig NPY als Kotransmitter. Diese Fasern haben in der Lamina adventitia und der Lamina submucosa vor allem regulatorische Wirkung auf die Durchblutung. In der Atemwegsmuskulatur führt ihre Stimulation zu einer Beta-2-Rezeptor-vermittelten Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und damit zur Reduktion des Muskeltonus. Über präsynaptische Alpha-2-Rezeptoren auf postganglionären parasympathischen Nervenendigungen reguliert NA außerdem die ACh-Ausschüttung und nimmt so indirekt Einfluss auf den Muskeltonus.

Den dritten und im Rahmen dieser Arbeit neu identifizierten Teil der autonomen Innervation stellt der nichtadrenerge-nichtcholinerge Innervationsweg dar. NO und VIP, aber auch NPY sind Überträgerstoffe dieses Systems. Ursprungsneurone nichtadrenerger-nichtcholinерger autonomer postganglionärer Efferenzen können zum einen in sympathischen Grenzstrangganglien, zum anderen in myenterischen Ganglien des Oesophagus liegen. Hauptziel dieser Fasern ist offensichtlich die glatte Atemwegsmuskulatur, in der NO über eine Stimulation der Guanylatzyklase und VIP über eine Stimulation der Adenylatzyklase zu einer Reduktion des Muskeltonus führt. NPY reguliert in diesem Rahmen den Ruhetonus der glatten Atemwegsmuskulatur und inhibiert über präsynaptische Rezeptoren auf postganglionären autonomen Nervenendigungen deren Transmitterausschüttung.

### **4.3 Die autonome Innervation des Herzens**

#### **4.3.1 Die Innervation des Herzens durch ChAT-immunreaktive Nervenfasern**

ChAT-immunreaktive Nervenfasern im Herzen des Meerschweinchens zeigten in der vorliegenden Untersuchung das von früheren Studien (Steele et Choate 1994) bekannte Verteilungsmuster. ChAT-immunreaktive Fasern, die vor allem die Vorhofmuskulatur und das Reizleitungsgewebe innervierten, hatten ihre Ursprungsneurone in den zahlreichen intrinsischen Herzganglien (Steele et al. 1996). Auch die vereinzelt vorkommenden ChAT/NOS- und ChAT/NPY-immunreaktiven Nervenfasern entstammten sicherlich den lokalen Ganglienzellen, denn auch in diesen ließ sich neben ChAT-Immunreaktivität regelmäßig NOS- und NPY-Immunreaktivität darstellen (Hassall et al. 1992, Klimaschewski et al. 1992, Dalsgaard et al. 1986, Kennedy et al. 1998). NOS-, NPY- und vor allem VIP-Immunreaktivität ließ sich nur vereinzelt in ChAT-immunreaktiven Fasern darstellen. NOS-, NPY- und VIP-immunreaktive Fasern sind demnach größtenteils nichtcholinergen Ursprungs.

Via muskarinerge M2-Rezeptoren (Jeck et al. 1988), die ebenfalls hauptsächlich im Vorhofbereich lokalisiert sind (Zhu et al. 1996), entfaltet ACh seine negativ chronotrope- und inotrope Wirkung (Jeck et al. 1988) am Herzen. Zusätzlich vermag ACh über die Stimulation präsynaptischer M2- und M3-Rezeptoren auf postganglionären sympathischen Efferenzen deren NA- und NPY-Ausschüttung zu inhibieren (Haunstetter et al. 1994, Olmez et al. 1995).

#### **4.3.2 Die Innervation des Herzens durch NOS-immunreaktive Nervenfasern**

NOS-immunreaktive Nervenfasern ließen sich früheren immunhistochemischen Untersuchungen entsprechend (Klimaschewski et al. 1992, Tanaka et al. 1993, Sosunov et al. 1995, 1996) vor allem in subepikardialen Myokardbereichen darstellen. Sie innervierten außerdem das Reizleitungsgewebe, die Koronargefäße und lokale Herzneurone (Hassall et al. 1992, Klimaschewski et al. 1992, Tanaka et al. 1993). Vereinzelt zeigten sie neben NOS-Immunreaktivität zusätzlich Immunreaktivität für ChAT. Diese entstammten demnach am

ehesten den wenigen lokalen Herzneuronen, die neben ChAT- auch NOS-Immunreaktivität zeigten (Klimaschewski et al. 1992). Da der Großteil der NOS-immunreaktiven Nervenfasern jedoch keine ChAT-Immunreaktivität zeigte, kommen die stets ChAT-immunreaktiven Herzganglienzellen als Ursprungsneurone dieser Fasern nicht in Frage. Stattdessen konnte wie bereits in der Atemwegsinnervation eine häufige Kolo-kalisation von NOS-Immunreaktivität mit NPY- und VIP-Immunreaktivität beobachtet werden. Mögliche Ursprungsneurone dieser nichtcholinergen NOS/NPY- und NOS/VIP-immunreaktiven Fasern sind neben nichtadrenergen NOS-immunreaktiven Grenzstrangneuronen (Höhler et al. 1995) NOS- und VIP-immunreaktive Ösophagusneurone. Deren Fasern projizieren bekannterweise in die glatte Atemwegsmuskulatur (Fischer et al. 1998, Moffatt et al. 1998) und erklären das häufige Vorkommen nichtcholinergere NOS/NPY- und NOS/VIP-immunreaktiver Fasern im Herzen am besten.

NO bewirkt am Herzen vor allem eine Abnahme des koronaren Gefäßwiderstandes (Kelm et Schrader 1990, Kelm et al. 1991, 1997). Seine Rolle als Vasodilatator wird durch die subepikardiale, Koronargefäß-nahe Lage der NOS-immunreaktiven Fasern unterstrichen. NO hat außerdem eine negativ inotrope Wirkung auf das Herz und führt zu einer verstärkten diastolischen Relaxation der Ventrikel (Kelm et al. 1991, 1997). Sowohl der positiv inotrope und chronotrope Effekt einer Betarezeptorenstimulation (Strasser et al. 1992) als auch der negativ chronotrope Effekt einer Vagusstimulation (Herring et al. 2000) werden durch NO inhibiert.

#### 4.3.3 Die Innervation des Herzens durch NPY-immunreaktive Nervenfasern

NPY-immunreaktive Nervenfasern zeigten in der vorliegenden Untersuchung das von früheren Studien bekannte Innervationsmuster. Sowohl im Vorhof als auch im Ventrikel konnte ein dichtes Netzwerk NPY-immunreaktiver Nervenfasern beobachtet werden, das mit dem Verteilungsmuster TH-immunreaktiver Fasern größtenteils übereinstimmte (Dalsgaard et al. 1986). Diese Fasern waren sympathischen Ursprungs und entstammen den ersten fünf thorakalen Grenzstrangganglien und dem Ganglion stellatum. Postganglionäre Fasern NA- und NPY-immunreaktiver Neurone projizierten zum Herzen und innervierten hier das Arbeitsmyokard, das Reizleitungssystem, die Koronargefäße und die intrinsischen

Ganglien (Uddman et al. 1985, Kennidy et al. 1998). Zusätzlich enthielten etliche intrinsische Herzneurone NPY-Immunreaktivität (Dalsgaard et al. 1986, Kennedy et al. 1998).

NPY zeigt am Herzen sehr unterschiedliche Effekte, deren Wirkung teilweise widersprüchlich erscheint. An ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte kann es deren Kontraktilität sowohl negativ als auch positiv beeinflussen. Einerseits aktiviert NPY den nach außen gerichteten Kaliumionenstrom, erhöht damit das Membranpotential und hat somit einen inhibierenden Einfluss auf die Kontraktilität der Herzmuskelzellen, andererseits ist NPY in der Lage, den langsamen Kalziumioneneinstrom zu aktivieren und dadurch die Kontraktilität der Kardiomyozyten zu verstärken (Millar et al. 1991). Beim Meerschweinchen bewirkt die systemische NPY-Gabe eine geringe Zunahme der Chrono- und Inotropie (Lundberg et al. 1984). NPY führt zu einem lang anhaltenden Anstieg des koronaren Gefäßwiderstandes (Franco-Cereceda et al. 1985) und inhibiert die durch ACh und VIP ausgelöste Relaxation der Koronargefäße (Gulbenkian et al. 1992). Via Rezeptoren auf postganglionären sympathischen und prä- und postganglionären parasympathischen Nervenendigungen vermag NPY die NA- und ACh-Ausschüttung zu inhibieren (Lundberg et al. 1984, Wahlestedt et al. 1987, Pardini et al. 1992) und so die Herzaktion indirekt zu beeinflussen.

#### 4.3.4 Die Innervation des Herzens durch VIP-immunreaktive Nervenfasern

VIP-immunreaktive Nervenfasern zeigten im Herzen eine ähnliche Verteilung wie die oben beschriebenen NOS-immunreaktiven Fasern. Sie innervierten vor allem subepikardiales Vorhofgewebe, das Reizleitungssystem und intrinsische Ganglien (Weihe et Reinecke 1981, Weihe et al. 1984). VIP-immunreaktive Fasern waren vergleichsweise selten zu beobachten (Della et al. 1983), zeigten dann jedoch häufig zusätzlich NPY- und NOS-Immunreaktivität. Die gemeinsame Darstellung von VIP- mit ChAT-Immunreaktivität bildete dagegen sicherlich die Ausnahme. Da weder die lokalen Atemwegsneurone noch die intrinsischen Herz- und Lungenvenenneurone VIP-Immunreaktivität zeigten (Della et al. 1983), sind sie nicht als potentielle Ursprungsneurone der VIP-immunreaktiven Nervenfasern aufzufassen. VIP-immunreaktive Neurone, deren Fasern potentiell zum Herzen projizieren und die



zudem NOS- bzw. NPY-Immunreaktivität zeigen, sind erneut in den sympathischen Grenzstrangganglien und in intrinsischen Ösophagusganglien zu vermuten. Am isoliert perfundierten Herzen des Meerschweinchens führt VIP zu einer dosisabhängigen Frequenzsteigerung und zu einer Abnahme der Kontraktilität (Hoover 1989). Beim Menschen führt die intrakoronare VIP-Gabe zu einem Abfall des aortalen Mitteldrucks und des myokardialen Sauerstoffverbrauchs bei gleichzeitigem Anstieg der linksventrikulären Inotropie und des Spitzendrucks (Popma et al. 1990). Bei beiden Spezies bewirkt VIP neben einer Senkung des systemischen Blutdrucks einen Abfall des koronaren Gefäßwiderstandes (Sata et al. 1986, Hoover 1989, Smitherman et al. 1989). In Anbetracht der subepikardialen Lage und der bekannten Innervation der Koronargefäße durch VIP-immunreaktive Fasern (Mawe et al. 1996) scheint neuronales VIP gerade für die zuletzt aufgeführte Wirkung von Relevanz zu sein. Gemeinsam mit NO stellt es damit den funktionellen Gegenspieler zum NA dar.

#### 4.3.5 Zusammenfassende Darstellung der Systeme

Zusammenfassend lässt das beschriebene Innervationsmuster neben der bereits bekannten funktionelle Dreiteilung auch eine anatomische Dreiteilung erkennen. Postsynaptische adrenerge Sympathikusfasern, deren Ursprungsneurone in den oberen thorakalen Grenzstrangganglien liegen, vermitteln am Herzen positiv bathmo-, chrono-, dromo- und inotrope Effekte. Postganglionäre cholinerge Parasympathikusfasern, deren Nervenzellkörper in lokalen Herzganglien liegen, führen am Herzen zu einer Abnahme von Schlagfrequenz, Erregungsleitung und Schlagkraft.

Nichtadrenerge-nichtcholinerge NOS-, NPY und VIP-immunreaktive Nervenfasern bilden den im Rahmen dieser Untersuchung neu identifizierten dritten Teil. Ihre Ursprungsneurone können in sympathischen Grenzstrangganglien und in parasympathischen intrinsischen Ösophagusganglien liegen, ihre Transmitterausschüttung scheint vor allem vasodilatatorische Effekte auf die Koronargefäße zu haben. Da jedoch speziell am Herzen die bekannten Wirkungen der drei genannten Transmittersubstanzen zum Teil völlig entgegengesetzt sind, lässt sich über den Nettoeffekt einer nichtadrenergen-nichtcholinergen Nervenstimulation noch keine klare Aussage treffen.

## **4.4 Die autonome Innervation der pulmonalen Gefäße**

### **4.4.1 Die Innervation der pulmonalen Gefäße durch ChAT-immunreaktive Nervenfasern**

Verglichen mit der ausgeprägten adrenergen Innervation (Kummer et al. 1992, Haberberger et al. 1997) spielt die cholinerge Innervation des pulmonalen Gefäßsystems sicherlich eine untergeordnete Rolle. Während eine frühere immunhistologische Untersuchung ChAT-immunreaktive Nervenfasern in extra- und intrapulmonalen Arterien und Venen bis zu einem Durchmesser von 50 µm beschrieb (Haberberger et al. 1997), konnten in der vorliegenden Studie nur in den von Herzmuskulatur gebildeten vorhofnahen Lungenvenen regelmäßig ChAT-immunreaktive Fasern nachgewiesen werden. Allenfalls vereinzelt kamen ChAT-immunreaktive Nervenfasern außerdem in der Adventitia des herznahen Truncus pulmonalis zur Darstellung. Diese Unterschiede könnten sich zum einen auf die verschiedenen Primärintensitäten, die in beiden Studien benutzt wurden, zum anderen auf Variationen zwischen verschiedenen Meerschweinchenzüchtungen zurückführen lassen.

Präganglionäre cholinerge Efferenzen entstammen auch hier dem Nucleus ambiguus und ziehen mit dem Nervus vagus zu intrinsischen Ganglien (Daly et Hebb 1966). Hier findet die synaptische Umschaltung auf postganglionäre cholinerge Neurone statt, deren Fasern zu den extrapulmonalen Venen projizieren. Ohne dafür sichere Beweise zu haben, wird davon ausgegangen, dass diese Fasern lokalen, stets ChAT-immunreaktiven Neuronen entstammen, die im Bereich der Lungenvenenmündung in großer Anzahl zu finden sind (Steele et Choate 1994). Für diese Vermutung spricht, dass sowohl in den lokalen Nervenzellkörpern als auch in den besagten ChAT-immunreaktiven Fasern vereinzelt NOS- bzw. NPY-Immunreaktivität nachzuweisen ist.

Untersuchungen über den Effekt von ACh auf die pulmonale Durchblutung haben unterschiedliche Ergebnisse erbracht. Einerseits wurde ACh eine vasokonstriktorische (Sada et al. 1987), andererseits eine vasodilatatorische Wirkung (Nandiwada et al. 1983, Cherry et Gillis 1987) zugeschrieben. Neben speziesspezifischen Unterschieden zwischen verschiedenen Tierarten wurde vor allem der initiale Gefäßtonus für die widersprüchlichen Ergebnisse verantwortlich gemacht. Unter Normalbedingungen führte ACh bei der Katze zu einer Erhöhung des Gefäßwiderstandes, während ein bereits vokontrahiertes Gefäßbett durch ACh erweitert wurde (Hyman et Kadowitz 1986). Beim Menschen führte ACh zu

einer deutlichen Vasodilatation, sowohl unter Normalbedingungen, als auch unter den Bedingungen einer akuten pulmonalen Vasokonstriktion (Fritts et al. 1958). Diese Vasodilatation war offensichtlich von endothelialen Faktoren abhängig, denn sie ging verloren, sobald das Gefäßendothel entfernt wurde. Unter diesen Bedingungen zeigte ACh geringe vasokonstriktorische Wirkung (Greenberg et al. 1987). Später stellte sich heraus, dass ACh über endotheliale M3-Rezeptoren (Mak et Barnes 1990) eine NO-Freisetzung aus dem Gefäßendothel induziert, die ihrerseits zur Vasodilatation führt.

#### 4.4.2 Die Innervation der pulmonalen Gefäße durch NOS-immunreaktive Nervenfasern

NOS-immunreaktive Nervenfasern waren entsprechend früheren Untersuchungen (Fischer et al. 1993, Haberberger et al. 1997) entlang der pulmonalen Arterien mit zur Peripherie abnehmender Häufigkeit darzustellen. Pulmonale Venen zeigten in dieser und in früheren Untersuchungen (Haberberger et al. 1997) nur in den von Herzmuskulatur gebildeten Wandabschnitten NOS-immunreaktive Fasern. NOS-Immunreaktivität war auch im Bereich der pulmonalen Gefäße häufig mit NPY- oder mit VIP-Immunreaktivität in einer Nervenfaser kolokalisiert. ChAT-Immunreaktivität zeigte dagegen nur ein geringer Prozentsatz der NOS-immunreaktiven Nervenfasern. Das heißt wiederum, dass weder die lokalen Atemwegsneurone noch die intrinsischen Herz- und Lungenvenenneurone als Ursprungsneurone dieser Fasern in Frage kommen. Mögliche Ursprungsneurone stellen also auch hier, wie bereits bei der Atemwegsinnervation diskutiert, die nonadrenergen Sympathikusneurone (Höhler et al. 1995) und die NOS- und VIP-immunreaktiven Ösophagusneurone dar.

NO gilt als inhibitorischer nichtadrenerger-nichtcholinerg Neurotransmitter, führt also zu einer von NA und ACh unabhängigen Vasodilatation. Seine Wirkung an der glatten Muskulatur entfaltet NO über die Aktivierung der Guanylatzyklase, welche die Umwandlung von GTP zu cGMP, einem wichtigen Second Messenger-Molekül, katalysiert (Bush et al. 1992). Durch cGMP werden wiederum spezifische Proteinkinasen aktiviert, die in der Lage sind, den Tonus der glatten Muskulatur vor allem über eine Verminderung des freien Kalziums im Zytosol zu vermindern (Waldman et Murad 1988). Unter adrenerger und cholinerg Blockade führte elektrische Feldstimulation zu einer

stimulationsfrequenzabhängigen Relaxation der Meerschweinchenpulmonalarterie. Diese Gefäßerweiterung ließ sich zum einen durch Tetrodotoxin, was deren neuronale Genese bewies, zu anderen durch NO-Synthasehemmer inhibieren (Liu et al. 1992). Während die Inhibition der Guanylatzyklase die stimulationsabhängige Relaxation der Pulmonalarterie weitgehend verhinderte, führte die Hemmung des cGMP-Abbaus durch einen selektiven Phosphodiesterase-5-Antagonisten zu einer vermehrten Vasodilatation (Liu et al. 1992).

#### 4.4.3 Die Innervation der pulmonalen Gefäße durch VIP-immunreaktive Nervenfasern

VIP-immunreaktive Nervenfasern zeigten ein nahezu identisches Verteilungsmuster wie die NOS-immunreaktiven Fasern. Entlang des gesamten arteriellen Pulmonalgefäßbettes waren sie entsprechend früheren immunhistochemischen Untersuchungen (Kummer et al. 1992) mit zur Lungenperipherie hin abnehmender Häufigkeit darzustellen. Einzig im Bereich der extrapulmonalen Lungenvenen war ihre Anzahl verglichen mit den NOS-immunreaktiven Nervenfasern geringer. VIP-immunreaktive Fasern zeigten häufig gleichzeitig NOS- bzw. NPY-Immunreaktivität. ChAT-Immunreaktivität hingegen war in den VIP-immunreaktiven Fasern nur in Ausnahmefällen darzustellen. Keines der intrinsischen Atemwegs-, Herz oder Pulmonalvenenneurone zeigte VIP-Immunreaktivität. Die oft vermutete Kotransmitterrolle des VIP in cholinergen Neuronen konnte daher auch im pulmonalen Gefäßbett des Meerschweinchens nicht bestätigt werden. Lokale Ganglienzellen scheiden als Ursprungsneurone VIP-immunreaktiver Fasern aus. Erneut sind es nonadrenerge Sympathikusneurone (Bowden et Gibbins 1992, Kummer et al. 1992, Höhler et al. 1995) und die bereits erwähnten intrinsischen Ösophagusneurone (Fischer et al. 1998), die als Ursprungsneurone dieser Fasern zur Diskussion stehen. Aufgrund ihrer geringen Zahl können erstere sicherlich nur für einen geringen Prozentsatz der relativ zahlreichen VIP-, VIP/NOS- und VIP/NPY-immunreaktiven Nervenfasern verantwortlich gemacht werden. Sehr wahrscheinlich sind es die VIP- und NOS-immunreaktiven Ösophagusneurone, deren Fasern außer in die Atemwegsmuskulatur auch zu den Pulmonalgefäßen projizieren. Von VIP ist bekannt, dass es Pulmonalarterien sowohl in vitro (Barnes et al. 1986, Greenberg et al. 1987), als auch in vivo (Minkes et al. 1992) dilatiert. Diese Dilatation ist endothelunabhängig und lässt sich durch NO-Synthetasehemmer nicht beeinflussen (Minkes

et al. 1992). Neuronal freigesetztes VIP bindet an glattmuskulären VIP-Rezeptoren, die sich autoradiographisch in Pulmonalarterien von Mensch und Meerschweinchen nachweisen ließen (Carstairs et Barnes 1986). VIP führt nach Bindung an seinen Rezeptor zu einer Aktivierung der membranständigen Adenylatzyklase und somit zu einer vermehrten Produktion von cAMP. Zyklisches AMP aktiviert seinerseits spezifische Proteinkinasen, die in der Lage sind, den Tonus der glatten Muskulatur zu reduzieren.

#### 4.4.4 Die Innervation der Pulmonalgefäße durch NPY-immunreaktive Nervenfasern

NPY-immunreaktive Nervenfasern waren wie in früheren immunhistochemischen Untersuchungen (Kummer et al. 1992) entlang des gesamten arteriellen und venösen Pulmonalgefäßbettes darzustellen. Ihre Anzahl war bei weitem größer als die der ChAT-, NOS- oder VIP-immunreaktiven Fasern. Von der überwiegenden Mehrzahl NPY-immunreaktiver Fasern konnte gezeigt werden, dass sie außer für NPY auch für TH immunreaktiv waren (Kummer et al. 1992). Fasern, die neben NPY auch VIP-Immunreaktivität zeigten, waren dagegen TH-negativ (Bowden et Gibbins 1992, Kummer et al. 1992). Fasern, in denen sich NPY und NOS kolokalisieren ließen, waren höchstwahrscheinlich ebenfalls nichtadrenerg, denn nur ein minimaler Prozentsatz NOS-immunreaktiver Sympathikusneurone zeigte gleichzeitig Immunreaktivität für TH (Höhler et al. 1995). Während es sich bei den NPY/TH-immunreaktiven Nervenfasern um postganglionäre Fasern sympathischen Ursprungs handelte, ist die Herkunft der nichtadrenergen NPY-immunreaktiven Fasern nicht vollständig geklärt. Erneut sind es die intrinsischen Ösophagusneurone (Fischer et al. 1998), die neben den wenigen nichtadrenergen Sympathikusneuronen (Bowden et Gibbins 1992, Kummer et al. 1992, Höhler et al. 1995) als Ursprungsneurone dieser Fasern in Frage kommen.

#### 4.4.5 Zusammenfassende Darstellung der Systeme

Zusammenfassend lässt sich also auch im Bereich der extra- und intrapulmonalen Lungengefäße eine anatomische und funktionelle Dreiteilung erkennen. Vorherrschend ist hier sicherlich der sympathische, überwiegend adrenerge Innervationsweg (Kummer et al. 1992). Er ist mit seinen Neurotransmittern NA und NPY für eine Erhöhung des pulmonalen Gefäßwiderstandes verantwortlich. Der klassische parasympathische cholinerge Innervationsweg spielt dagegen zumindest beim Meerschweinchen eine allenfalls unbedeutende Rolle. Wichtigstes Ergebnis dieser Untersuchung ist, dass ein dritter anatomisch getrennter, nichtadrenerger-nichtcholinerg Innervationsweg vor allem im Bereich der arteriellen Pulmonalgefäße darzustellen ist. Neben NPY nutzen seine Neurone NO und VIP zu Signalübertragung. Da VIP ähnlich wie NO eine inhibitorische, also vasodilatatorische Wirkung auf die Pulmonalgefäße ausübt, ist ihre gemeinsame Ausschüttung aus einer Nervenendigung durchaus sinnvoll. Während NO die Guanylatzyklase aktiviert, ist es beim VIP die Adenylatzyklase, die zur Second Messenger vermittelten Gefäßrelaxation führt. Der Ursprung dieser nichtadrenergen-nichtcholinergen Fasern ist bisher nicht 100%ig geklärt. Tracingexperimente an lebenden Tieren sind aufgrund der herzsclagsynchronen Pulsation der Pulmonalgefäße überaus schwierig durchzuführen. Nur durch Degenerationsexperimente ließe sich die Zahl der zur Diskussion stehenden Ursprungsneurone stärker einkreisen.

Intrinsische Ganglienzellen entlang des Tracheobronchialstammes kommen jedenfalls als Ursprungsneurone dieser Fasern nicht in Frage, da sie weder NOS-, noch VIP-, noch NPY-Immunreaktivität zeigten (Bowden et Gibbins 1992, Kummer et al. 1992, Fischer et al. 1996). Herzneurone zeigten in einigen Fällen NOS- und NPY-Immunreaktivität, kämen also als Ursprungsneurone für NOS- und NPY-immunreaktive Fasern in Frage. Da jedoch sämtliche Herzneurone Immunreaktivität für ChAT zeigten (Steele et al. 1993), fallen auch sie als potentielle Ursprungsneurone besagter Nervenfasern aus. Die wenigen nichtadrenergen Sympathikusneuronen, deren Fasern außer zu den Atemwegen auch zu den Lungengefäßen projizieren könnten, können die relativ große Anzahl besagter Nervenfasern nicht erklären (Kummer et al. 1992). Erneut sind es die nichtcholinergen Ösophagusneurone deren Fasern zu den Atemwegen projizieren (Fischer et al. 1992, Moffatt et al. 1998), die wir als Ursprungsneurone NOS-, NPY- und VIP-immunreaktiver Fasern vermuten.

## **5 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob Stickstoffmonoxid (NO) und die Neuropeptide Vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) und Neuropeptid Y (NPY) in der autonomen Regulation der Brusteingeweide als Kotransmitter klassischer Transmitter agieren oder aus einer separaten Entität autonomer Nervenfasern freigesetzt werden. Hierzu wurden mit der Doppelimmunfluoreszenz-Technik die möglichen Koexistenzen von Cholinazetyltransferase (ChAT)- (Synthaseenzym von Azetylcholin), NO-Synthase (NOS)- (Synthaseenzym von NO), NPY- und VIP-Immunreaktivität in autonomen Nervenzellkörpern und Nervenfasern der Atemwege, des Herzens und der pulmonalen Gefäße des Meerschweinchens untersucht. Die Ergebnisse der zunächst durchgeführten ChAT-, NOS-, NPY- und VIP-Einzelimmunfluoreszenzen entsprachen in nahezu allen untersuchten Geweben den Ergebnissen früherer Studien. Einzige Ausnahme war die Innervation arterieller und venöser Pulmonalgefäße durch ChAT-immunreaktive Nervenfasern. Während eine frühere immunhistologische Untersuchung ChAT-immunreaktive Nervenfasern in extra- und intrapulmonalen Arterien und Venen bis zu einem Durchmesser von 50 µm beschrieb (Haberberger et al. 1997), konnten in der vorliegenden Studie nur in den herznahen Lungenvenen regelmäßig ChAT-immunreaktive Fasern nachgewiesen werden. Allenfalls vereinzelt kamen ChAT-immunreaktive Fasern außerdem in der Adventitia des herznahen Truncus pulmonalis zur Darstellung. Diese Unterschiede könnten sich zum einen auf die verschiedenen Primärantiseren, die in beiden Studien benutzt wurden, zum anderen auf Variationen zwischen verschiedenen Meerschweinchenzüchtungen zurückführen lassen.

Die Ergebnisse der Doppelimmunfluoreszenzen zeigten in sämtlichen untersuchten Geweben ein übereinstimmendes Innervationsprinzip. In den Atemwegen, im Herzen und in den pulmonalen Gefäßen zeigten ChAT-immunreaktive Nervenfasern nur in Ausnahmefällen Immunreaktivität für NOS, NPY oder VIP. NO und die beiden Neuropeptide NPY und VIP scheiden daher in den hier untersuchten Meerschweinchen-Organen als typische Kotransmitter cholinergischer Neurone aus. Neben nur ChAT-immunreaktiven, cholinergen Nervenfasern waren zahlreiche nur NPY-immunreaktive Nervenfasern darzustellen, von denen wir wissen, dass sie größtenteils Tyrosinhydroxylase (TH)-Immunreaktivität aufweisen und sympathischen Ursprungs sind (Dalsgaard et al. 1986, Kummer et al. 1992).

In nahezu allen untersuchten Geweben ließen sich außerdem regelmäßig Nervenfasern darstellen, in denen NOS mit NPY, NOS mit VIP und NPY mit VIP kolokalisiert waren. Im Gegensatz zu nur NOS- und nur VIP-immunreaktiven Nervenfasern war die Zahl dieser Kolokalisationen jeweils so groß, dass sie nur durch ein gemeinsames Vorkommen aller drei Antigene in einem Nervenfasertyp zu erklären sind. Da wir weiterhin aus früheren Untersuchungen wissen, dass ein Großteil dieser Fasern nicht TH-immunreaktiv, d.h. nichtadrenerg ist (Bowen et Gibbins 1992, Kummer et al. 1992), können wir von einem anatomisch separaten nichtadrenergen-nichtcholinergen autonomen Innervationsweg ausgehen, dessen Fasern NO, NPY und VIP zur Neurotransmission benutzen.

Anhand dieser Ergebnisse ist es nun möglich, den Ursprung dieser Fasern zu bestimmen bzw. die möglichen Ursprünge stark einzugrenzen. Da sämtliche intrinsischen Atemwegs- und Herzneurone ChAT exprimieren, werden sie als Ursprungsneurone ChAT-immunreaktiver Fasern betrachtet. Als Ursprungsneurone besagter ChAT-negativer, NOS/NPY/VIP-immunreaktiver Fasern kommen sie dagegen nicht in Frage. Von früheren Untersuchungen ist bekannt, dass NOS und VIP nur in nichtadrenergen postganglionären Sympathikusneuronen darzustellen waren (Kummer et al. 1992, Höhler et al. 1995). Weder NO noch VIP sind demnach Kotransmitter adrenerger Sympathikusneurone. Von einigen nichtadrenergen sympathischen Grenzstrangneuronen des Meerschweinchens weiß man, dass ihre Fasern in die Atemwege projizieren (Bowden et Gibbins 1992, Kummer et al. 1992), und dass sich in ihnen außerdem die erforderlichen Neurotransmitterkombinationen darstellen lassen (Bowden et Gibbins 1992, Höhler et al. 1995). Ihre Zahl ist jedoch zu gering, um die insgesamt relativ große Anzahl NOS-, NPY- und VIP-immunreaktiver Fasern zu erklären. Es ist daher naheliegend zu vermuten, dass ein Großteil der nichtadrenergen-nichtcholinergen NOS/NPY/VIP-immunreaktiven Fasern im Herzen und den Lungengefäßen ihren Ursprung in postganglionären parasympathischen Neuronen in myenterischen Ganglien des Ösophagus haben, bei denen durch elektrophysiologische und retrograde Markierungsstudien belegt ist, dass sie die glatte Atemwegsmuskulatur des Meerschweinchens innervieren (Fischer et al. 1998, Moffatt et al. 1998).

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass die hier untersuchten Transmittersubstanzen NO, NPY und VIP in der autonomen Regulation der Atemwege, der pulmonalen Gefäße und des Herzens nicht wie bisher vermutet als Kotransmitter adrenerger und cholinерger Neurone auszufassen sind, sondern dass sie von anatomisch getrennten Neuronen synthetisiert



werden. Ein kleinerer Anteil dieser Fasern kann postganglionären sympathischen Grenzstrangganglien entstammen, ein grösserer Teil entspringt aller Voraussicht nach intrinsischen Ösophagusneuronen. Die seit langem angenommene reine Zweiteilung des autonomen Nervensystems in einen adrenergen und einen cholinergen Anteil kann daher für die Thoraxorgane nicht weiter aufrecht erhalten werden.

## **6 Literaturverzeichnis**

**Aakerlund L, Gether U, Fuhlendorff J, Schwartz TW, Thastrup O.**

Y1 receptors for neuropeptide Y are coupled to mobilization of intracellular calcium and inhibition of adenylate cyclase.  
FEBS Lett. 1990;260:73-8.

**Allen TG, Burnstock G.**

M1 and M2 muscarinic receptors mediate excitation and inhibition of guinea-pig intracardiac neurones in culture.  
J Physiol. 1990;422:463-80.

**Andersson RG, Grundstrom N.**

Innervation of airway smooth muscle. Efferent mechanisms.  
Pharmacol Ther. 1987;32:107-30. Review.

**Bao JX, Eriksson IE, Stjärne L.**

Neurotransmitters and pre- and post-junctional receptors involved in the vasoconstrictor response to sympathetic nerve stimulation in rat tail artery.  
Acta Physiol Scand. 1990;140:467-79.

**Barnes PJ, Cadieux A, Carstairs JR, Greenberg B, Polak JM, Rhoden K.**

Vasoactive intestinal peptide in bovine pulmonary artery: localisation, function and receptor autoradiography.  
Br J Pharmacol. 1986;89:157-62.

**Belvisi MG, Miura M, Stretton D, Barnes PJ.**

Endogenous vasoactive intestinal peptide and nitric oxide modulate cholinergic neurotransmission in guinea-pig trachea.  
Eur J Pharmacol. 1993;231:97-102.

**Belvisi MG, Stretton D, Barnes PJ.**

Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways.  
Eur J Pharmacol. 1991;198:219-21.

**Bloom SR, Edwards AV.**

Vasoactive intestinal peptide in relation to atropine resistant vasodilatation in the submaxillary gland of the cat.  
J Physiol. 1980;300:41-53.

**Bowden JJ, Gibbins IL.**

Vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y coexist in non-noradrenergic sympathetic neurons to guinea pig trachea.  
J Auton Nerv Syst. 1992;38:1-19.

**Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH.**

Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites.  
J Biol Chem. 1992;267:10976-81.

**Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH.**

Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide.  
Nature. 1990;347:768-70.

**Bredt DS, Snyder SH.**

Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87:682-5.

**Bredt DS, Snyder SH.**

Nitric oxide, a novel neuronal messenger.  
Neuron. 1992;8:3-11. Review.

**Burnstock G.**

Overview. Purinergic mechanisms.  
Ann N Y Acad Sci. 1990;603:1-17; discussion 18. Review.

**Burnstock G.**

Sympathetic purinergic transmission in small blood vessels.  
Trends Pharmacol Sci. 1988;9:116-7. Review.

**Burnstock G, Kennedy C.**

A dual function for adenosine 5'-triphosphate in the regulation of vascular tone. Excitatory cotransmitter with noradrenaline from perivascular nerves and locally released inhibitory intravascular agent.  
Circ Res. 1986;58:319-30.

**Bush PA, Gonzalez NE, Griscavage JM, Ignarro LJ.**

Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine.  
Biochem Biophys Res Commun. 1992;185:960-6.

**Busse R, Mülsch A.**

Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. FEBS Lett. 1990;265:133-6.

**Cadieux A, Benckekroun MT, St-Pierre S, Fournier A.**

Bronchoconstrictor action of neuropeptide Y (NPY) in isolated guinea pig airways. Neuropeptides. 1989;13:215-9.

**Canning BJ, Fischer A.**

Localization of cholinergic nerves in lower airways of guinea pigs using antisera to choline acetyltransferase. Am J Physiol. 1997;272:L731-8.

**Canning BJ, Udem BJ.**

Evidence that distinct neural pathways mediate parasympathetic contractions and relaxations of guinea-pig trachealis. J Physiol. 1993;471:25-40.

**Canning BJ, Udem BJ.**

Relaxant innervation of the guinea-pig trachealis: demonstration of capsaicin-sensitive and -insensitive vagal pathways. J Physiol. 1993;460:719-39.

**Carstairs JR, Barnes PJ.**

Visualization of vasoactive intestinal peptide receptors in human and guinea pig lung. J Pharmacol Exp Ther. 1986;239:249-55.

**Ceccatelli S, Lundberg JM, Fahrenkrug J, Bredt DS, Snyder SH, Hokfelt T.**

Evidence for involvement of nitric oxide in the regulation of hypothalamic portal blood flow. Neuroscience. 1992;51:769-72.

**Cech S.**

Cholinesterase-containing nerve fibres on blood vessels in lungs of some laboratory mammals. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 1973;140:91-100.

**Cherry PD, Gillis CN.**

Evidence for the role of endothelium-derived relaxing factor in acetylcholine-induced vasodilatation in the intact lung. J Pharmacol Exp Ther. 1987;241:516-20.

**Dahlof C, Dahlof P, Lundberg JM.**

Alpha 2-adrenoceptor-mediated inhibition of nerve stimulation-evoked release of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in the pithed guinea-pig.  
Eur J Pharmacol. 1986;131:279-83.

**Dahlof P, Persson K, Lundberg JM, Dahlof C.**

Neuropeptide Y (NPY) induced inhibition of preganglionic nerve stimulation evoked release of adrenalin and noradrenaline in the pithed rat.  
Acta Physiol Scand. 1988;132:51-7.

**Dahlof P, Tarizzo VI, Lundberg JM, Dahlof C.**

Alpha- and beta-adrenoceptor-mediated effects on nerve stimulation-evoked release of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in the pithed guinea pig.  
J Auton Nerv Syst. 1991;35:199-210.

**Dalsgaard CJ, Franco-Cereceda A, Saria A, Lundberg JM, Theodorsson-Norheim E, Hokfelt T.**

Distribution and origin of substance P- and neuropeptide Y-immunoreactive nerves in the guinea-pig heart.  
Cell Tissue Res. 1986;243:477-85.

**Daly IDB, Hebb C.**

Innervation of the lungs.  
*In Pulmonary and Bronchial Vascular Systems*, ed. By I.D.B. Daly and C. Hebb, William & Wilkins, Baltimore. 1966:89-117.

**Della NG, Papka RE, Furness JB, Costa M.**

Vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in nerves associated with the cardiovascular system of guinea-pigs.  
Neuroscience. 1983;9:605-19.

**Doelman CJ, Sprong RC, Nagtegaal JE, Rodrigues de Miranda JF, Bast A.**

Prejunctional muscarinic receptors on cholinergic nerves in guinea pig airways are of the M2 subtype.  
Eur J Pharmacol. 1991;193:117-9.

**Edvinsson L, Emson P, McCulloch J, Tatemoto K, Uddman R.**

Neuropeptide Y: cerebrovascular innervation and vasomotor effects in the cat.  
Neurosci Lett. 1983;43:79-84.

**Ekblad E, Edvinsson L, Wahlestedt C, Uddman R, Hakanson R, Sundler F.**

Neuropeptide Y co-exists and co-operates with noradrenaline in perivascular nerve fibers.  
Regul Pept. 1984;8:225-35.

**Fischer A, Canning BJ, Kummer W.**

Correlation of vasoactive intestinal peptide and nitric oxide synthase with choline acetyltransferase in the airway innervation.  
Ann N Y Acad Sci. 1996;805:717-22.

**Fischer A, Canning BJ, Undem BJ, Kummer W.**

Evidence for an esophageal origin of VIP-IR and NO synthase-IR nerves innervating the guinea pig trachealis: a retrograde neuronal tracing and immunohistochemical analysis.  
J Comp Neurol. 1998;394:326-34.

**Fischer A, Kummer W, Couraud JY, Adler D, Branscheid D, Heym C.**

Immunohistochemical localization of receptors for vasoactive intestinal peptide and substance P in human trachea.  
Lab Invest. 1992;67:387-93.

**Fischer A, Mayer B, Kummer W.**

Nitric oxide synthase in vagal sensory and sympathetic neurons innervating the guinea-pig trachea.  
J Auton Nerv Syst. 1996;56:157-60.

**Fischer A, Mundel P, Mayer B, Preissler U, Philippin B, Kummer W.**

Nitric oxide synthase in guinea pig lower airway innervation.  
Neurosci Lett. 1993;149:157-60.

**Folkow B, Uvnäs B.**

The chemical transmission of vasoconstrictor impulses to the hind limbs and the splanchnic region of the cat.  
Acta Physiol Scand. 1948;15:365-88.

**Forssmann WG, Ito S, Weihe E, Aoki A, Dym M, Fawcett DW.**

An improved perfusion fixation method for the testis.  
Anat Rec. 1977;188:307-14.

**Forssmann WG, Triepel J, Daffner C, Heym C, Cuevas P, Noble MI, Yanaihara N.**

Vasoactive intestinal peptide in the heart.  
Ann N Y Acad Sci. 1988;527:405-20. Review.

**Franco-Cereceda A, Lundberg JM, Dahlöf C.**

Neuropeptide Y and sympathetic control of heart contractility and coronary vascular tone.  
Acta Physiol Scand. 1985;124:361-9.

**Franco-Cereceda A, Matran R, Alving K, Lundberg JM.**

Sympathetic vascular control of the laryngeal-tracheal, bronchial and pulmonary circulation in the pig: evidence for non-adrenergic mechanisms involving neuropeptide Y.  
*Acta Physiol Scand.* 1995;155:193-204.

**Fried G, Lundberg JM, Theodorsson-Norheim E.**

Subcellular storage and axonal transport of neuropeptide Y (NPY) in relation to catecholamines in the cat.  
*Acta Physiol Scand.* 1985;125:145-54.

**Fried G, Terenius L, Hokfelt T, Goldstein M.**

Evidence for differential localization of noradrenaline and neuropeptide Y in neuronal storage vesicles isolated from rat vas deferens.  
*J Neurosci.* 1985;5:450-8.

**Fujita M, Schroeder MA, Hyatt RE.**

Canine model of chronic bronchial injury. Lung mechanics and pathologic changes.  
*Am Rev Respir Dis.* 1988;137:429-34.

**Furchgott RF, Zawadzki JV.**

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.  
*Nature.* 1980;288:373-6.

**Gotti C, Fornasari D, Clementi F.**

Human neuronal nicotinic receptors.  
*Prog Neurobiol.* 1997;53:199-237. Review.

**Greenberg B, Rhoden K, Barnes PJ.**

Endothelium-dependent relaxation of human pulmonary arteries.  
*Am J Physiol.* 1987;252:H434-8.

**Grundemar L, Hogestatt ED.**

Unmasking the vasoconstrictor response to neuropeptide Y and its interaction with vasodilating agents in vitro.  
*Eur J Pharmacol.* 1992;221:71-6.

**Grundemar L, Jonas SE, Morner N, Hogestatt ED, Wahlestedt C, Hakanson R.**

Characterization of vascular neuropeptide Y receptors.  
*Br J Pharmacol.* 1992;105:45-50.

**Grundemar L, Widmark E, Waldeck B, Hakanson R.**

Neuropeptide Y: prejunctional inhibition of vagally induced contractions in the guinea pig trachea.

Regul Pept. 1988;23:309-13.

**Gu J, Polak JM, Adrian TE, Allen JM, Tatemoto K, Bloom SR.**

Neuropeptide tyrosine (NPY)--a major cardiac neuropeptide.

Lancet. 1983;1:1008-10.

**Gulbenkian S, Edvinsson L, Saetrum Opgaard O, Valenca A, Wharton J, Polak JM.**

Neuropeptide Y modulates the action of vasodilator agents in guinea-pig epicardial coronary arteries.

Regul Pept. 1992;40:351-62.

**Haass M, Cheng B, Richardt G, Lang RE, Schomig A.**

Characterization and presynaptic modulation of stimulation-evoked exocytotic co-release of noradrenaline and neuropeptide Y in guinea pig heart.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1989;339:71-8.

**Haberberger R, Schemann M, Sann H, Kummer W.**

Innervation pattern of guinea pig pulmonary vasculature depends on vascular diameter.

J Appl Physiol. 1997;82:426-34.

**Hand JM, Laravuso RB, Will JA.**

Relaxation of isolated guinea pig trachea, bronchi and pulmonary arteries produced by vasoactive intestinal peptide (VIP).

Eur J Pharmacol. 1984;98:279-84.

**Hassall CJ, Saffrey MJ, Belai A, Hoyle CH, Moules EW, Moss J, Schmidt HH, Murad F, Forstermann U, Burnstock G.**

Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diaphorase activity in a subpopulation of intrinsic neurones of the guinea-pig heart.

Neurosci Lett. 1992;143:65-8.

**Haunstetter A, Haass M, Yi X, Kruger C, Kubler W.**

Muscarinic inhibition of cardiac norepinephrine and neuropeptide Y release during ischemia and reperfusion.

Am J Physiol. 1994;267:R1552-8.

**Herring N, Golding S, Paterson DJ.**

Pre-synaptic NO-cGMP pathway modulates vagal control of heart rate in isolated adult guinea pig atria.

J Mol Cell Cardiol. 2000;32:1795-804.



**Herzog H, Hort YJ, Ball HJ, Hayes G, Shine J, Selbie LA.**

Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:5794-8.

**Höhler B, Olry R, Mayer B, Kummer W.**

Nitric oxide synthase in guinea pig sympathetic ganglia: correlation with tyrosine hydroxylase and neuropeptides. *Histochem Cell Biol.* 1995;104:21-8.

**Hollenberg MD.**

Mechanisms of receptor-mediated transmembrane signalling. *Experientia.* 1986;42:718-27. Review.

**Holmgren S, Jensen J.**

Evolution of vertebrate neuropeptides. *Brain Res Bull.* 2001;55:723-35.

**Hoover DB.**

Effects of guinea pig vasoactive intestinal peptide on the isolated perfused guinea pig heart. *Peptides.* 1989;10:343-7.

**Hwang TL, Wu CC, Teng CM.**

Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol.* 1998;125:1158-63.

**Hyman AL, Kadowitz PJ.**

Enhancement of alpha- and beta-adrenoceptor responses by elevations in vascular tone in pulmonary circulation. *Am J Physiol.* 1986;250:H1109-16.

**Hyman AL, Lipton HL, Kadowitz PJ.**

Analysis of pulmonary vascular responses in cats to sympathetic nerve stimulation under elevated tone conditions. Evidence that neuronally released norepinephrine acts on alpha 1-, alpha 2-, and beta 2-adrenoceptors. *Circ Res.* 1990;67:862-70.

**Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G.**

Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:9265-9.

**Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS.**

Endothelium-dependent modulation of cGMP levels and intrinsic smooth muscle tone in isolated bovine intrapulmonary artery and vein.  
Circ Res. 1987;60:82-92.

**Itoh T, Sasaguri T, Makita Y, Kanmura Y, Kuriyama H.**

Mechanisms of vasodilation induced by vasoactive intestinal polypeptide in rabbit mesenteric artery.  
Am J Physiol. 1985;249:H231-40.

**Jackson VM, Cunnane TC.**

Neurotransmitter release mechanisms in sympathetic neurons: past, present, and future perspectives.  
Neurochem Res. 2001;26:875-89.

**Jeck D, Lindmar R, Loffelholz K, Wanke M.**

Subtypes of muscarinic receptor on cholinergic nerves and atrial cells of chicken and guinea-pig hearts.  
Br J Pharmacol. 1988;93:357-66.

**Johansson O, Lundberg JM.**

Ultrastructural localization of VIP-like immunoreactivity in large dense-core vesicles of 'cholinergic-type' nerve terminals in cat exocrine glands.  
Neuroscience. 1981;6:847-62.

**Kadowitz PJ, Knight DS, Hibbs RG, Ellison JP, Joiner PD, Brody MJ, Hyman AL.**

Influence of 5- and 6-hydroxydopamine on adrenergic transmission and nerve terminal morphology in the canine pulmonary vascular bed.  
Circ Res. 1976;39:191-9.

**Kaumann AJ.**

Some aspects of heart beta adrenoceptor function.  
Cardiovasc Drugs Ther. 1991;5:549-60. Review.

**Kelm M, Feelisch M, Deussen A, Strauer BE, Schrader J.**

Release of endothelium derived nitric oxide in relation to pressure and flow.  
Cardiovasc Res. 1991;25:831-6.

**Kelm M, Schafer S, Dahmann R, Dolu B, Perings S, Decking UK, Schrader J, Strauer BE.**

Nitric oxide induced contractile dysfunction is related to a reduction in myocardial energy generation.  
Cardiovasc Res. 1997;36:185-94.

**Kelm M, Schrader J.**

Control of coronary vascular tone by nitric oxide.  
Circ Res. 1990;66:1561-75.

**Kennedy AL, Harakall SA, Lynch SW, Braas KM, Hardwick JC, Mawe GM, Parsons RL.**

Expression and physiological actions of neuropeptide Y in guinea pig parasympathetic cardiac ganglia.  
J Auton Nerv Syst. 1998;71:190-5.

**Kilbinger H, von Bardeleben RS, Siefken H, Wolf D.**

Prejunctional muscarinic receptors regulating neurotransmitter release in airways.  
Life Sci. 1995;56:981-7.

**Klimaschewski L, Kummer W, Mayer B, Couraud JY, Preissler U, Philippin B, Heym C.**

Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart.  
Circ Res. 1992;71:1533-7.

**Knispel HH, Goessl C, Beckmann R.**

Nitric oxide mediates neurogenic relaxation induced in rabbit cavernous smooth muscle by electric field stimulation.  
Urology. 1992;40:471-6.

**Kubota E, Hamasaki Y, Sata T, Saga T, Said SI.**

Autonomic innervation of pulmonary artery: evidence for a nonadrenergic noncholinergic inhibitory system.  
Exp Lung Res. 1988;14:349-58.

**Kubota E, Sata T, Soas AH, Paul S, Said SI.**

Vasoactive intestinal peptide as a possible transmitter of nonadrenergic, noncholinergic relaxation of pulmonary artery.  
Trans Assoc Am Physicians. 1985;98:233-42.

**Kummer W.**

Retrograde neuronal labelling and double-staining immunohistochemistry of tachykinin- and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive pathways in the carotid sinus nerve of the guinea pig.  
J Auton Nerv Syst. 1988;23:131-41.

**Kummer W, Fischer A, Heym C.**

Ultrastructure of calcitonin gene-related peptide- and substance P-like immunoreactive nerve fibres in the carotid body and carotid sinus of the guinea pig.  
Histochemistry. 1989;92:433-9.

**Kummer W, Fischer A, Kurkowski R, Heym C.**

The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry.  
Neuroscience. 1992;49:715-37.

**Kummer W, Fischer A, Mundel P, Mayer B, Hoba B, Philippin B, Preissler U.**

Nitric oxide synthase in VIP-containing vasodilator nerve fibres in the guinea-pig.  
Neuroreport. 1992;3:653-5.

**Kummer W, Mayer B.**

Nitric oxide synthase-immunoreactive axons innervating the guinea-pig lingual artery: an ultrastructural immunohistochemical study using elastic brightfield imaging.  
Histochemistry. 1993;99:175-9.

**Kuwahara M, Amano H, Kubo T, Misu Y.**

Further evidence for tonically functioning presynaptic beta-adrenoceptors in guinea-pig pulmonary arteries.  
Arch Int Pharmacodyn Ther. 1986;284:225-30.

**Lacroix JS, Anggard A, Hokfelt T, O'Hare MM, Fahrenkrug J, Lundberg JM.**

Neuropeptide Y: presence in sympathetic and parasympathetic innervation of the nasal mucosa.  
Cell Tissue Res. 1990;259:119-28.

**Laitinen A, Partanen M, Hervonen A, Peltö-Huikko M, Laitinen LA.**

VIP like immunoreactive nerves in human respiratory tract. Light and electron microscopic study.  
Histochemistry. 1985;82:313-9.

**Langer SZ.**

Presence and physiological role of presynaptic inhibitory alpha 2-adrenoreceptors in guinea pig atria.  
Nature. 1981;294:671-2.

**Leblanc GG, Trimmer BA, Landis SC.**

Neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat cranial parasympathetic neurons: coexistence with vasoactive intestinal peptide and choline acetyltransferase.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84:3511-5.

**Lei YH, Barnes PJ, Rogers DF.**

Regulation of NANC neural bronchoconstriction in vivo in the guinea-pig: involvement of nitric oxide, vasoactive intestinal peptide and soluble guanylyl cyclase.  
Br J Pharmacol. 1993;108:228-35.

**Leonard S, Bertrand D.**

Neuronal nicotinic receptors: from structure to function.  
Nicotine Tob Res. 2001;3:203-23. Review.

**Lindgren S, Rascon A, Andersson KE, Manganiello V, Degerman E.**

Selective inhibition of cGMP-inhibited and cGMP-noninhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases and relaxation of rat aorta.  
Biochem Pharmacol. 1991;42:545-52.

**Lindstrom J.**

Neuronal nicotinic acetylcholine receptors.  
Ion Channels. 1996;4:377-450. Review.

**Liu SF, Crawley DE, Evans TW, Barnes PJ.**

Endothelium-dependent nonadrenergic, noncholinergic neural relaxation in guinea pig pulmonary artery.  
J Pharmacol Exp Ther. 1992;260:541-8.

**Liu SF, Crawley DE, Rohde JA, Evans TW, Barnes PJ.**

Role of nitric oxide and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate in mediating nonadrenergic, noncholinergic relaxation in guinea-pig pulmonary arteries.  
Br J Pharmacol. 1992;107:861-6.

**Loewi O, Navratil E.**

Überhumorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. X. Mitteilung. Über das Schicksal des Vagusstoff.  
Pflügers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere. 1926, 214, 678-688.

**Lundberg JM.**

Evidence for coexistence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and acetylcholine in neurons of cat exocrine glands. Morphological, biochemical and functional studies.  
Acta Physiol Scand Suppl. 1981;496:1-57.

**Lundberg JM, Al-Saffar A, Saria A, Theodorsson-Norheim E.**

Reserpine-induced depletion of neuropeptide Y from cardiovascular nerves and adrenal gland due to enhanced release.  
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1986;332:163-8.

**Lundberg JM, Anggard A, Fahrenkrug J, Hokfelt T, Mutt V.**

Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: functional significance of coexisting transmitters for vasodilation and secretion.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1980;77:1651-5.

**Lundberg JM, Fahrenkrug J, Hokfelt T, Martling CR, Larsson O, Tatemoto K, Anggard A.**

Co-existence of peptide HI (PHI) and VIP in nerves regulating blood flow and bronchial smooth muscle tone in various mammals including man.  
Peptides. 1984;5:593-606.

**Lundberg JM, Franco-Cereceda A, Lou YP, Modin A, Pernow J.**

Differential release of classical transmitters and peptides.  
Adv Second Messenger Phosphoprotein Res. 1994;29:223-34. Review.

**Lundberg JM, Hokfelt T, Anggard A, Lundblad L, Saria A, Fahrenkrug J, Terenius L.**

Neuropeptides with vascular activity: VIP, PHI, NPY and substance P.  
Bibl Cardiol. 1984;60-9.

**Lundberg JM, Hua XY, Franco-Cereceda A.**

Effects of neuropeptide Y (NPY) on mechanical activity and neurotransmission in the heart, vas deferens and urinary bladder of the guinea-pig.  
Acta Physiol Scand. 1984;121:325-32.

**Lundberg JM, Saria A, Anggard A, Hokfelt T, Terenius L.**

Neuropeptide Y and noradrenaline interaction in peripheral cardiovascular control.  
Clin Exp Hypertens A. 1984;6:1961-72.

**Lundberg JM, Stjärne L.**

Neuropeptide Y (NPY) depresses the secretion of 3H-noradrenaline and the contractile response evoked by field stimulation, in rat vas deferens.  
Acta Physiol Scand. 1984;120:477-9.

**Lundberg JM, Tatemoto K.**

Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to alpha-adrenoceptor blockade.  
Acta Physiol Scand. 1982;116:393-402.

**Lundberg JM, Terenius L, Hokfelt T, Goldstein M.**

High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man.  
Neurosci Lett. 1983;42:167-72.

**Mak JC, Barnes PJ.**

Muscarinic receptor subtypes in human and guinea pig lung.  
Eur J Pharmacol. 1989;164:223-30.

**Mak JC, Barnes PJ.**

Autoradiographic visualization of muscarinic receptor subtypes in human and guinea pig lung.  
Am Rev Respir Dis. 1990;141:1559-68.

**Matran R, Martling CR, Lundberg JM.**

Inhibition of cholinergic and non-adrenergic, non-cholinergic bronchoconstriction in the guinea pig mediated by neuropeptide Y and alpha 2-adrenoceptors and opiate receptors.  
Eur J Pharmacol. 1989;163:15-23.

**Mawe GM, Talmage EK, Lee KP, Parsons RL.**

Expression of choline acetyltransferase immunoreactivity in guinea pig cardiac ganglia.  
Cell Tissue Res. 1996;285:281-6.

**Mayer B, Schmidt K, Humbert P, Bohme E.**

Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells  $\text{Ca}^{2+}$ -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase.  
Biochem Biophys Res Commun. 1989;164:678-85.

**Mazzuco TL, Dias MA, Calixto JB.**

Characterization of the mechanism involved in the relaxant response of dopexamine in the guinea pig pulmonary artery in vitro.  
J Cardiovasc Pharmacol. 1999;33:86-92.

**McCormack DG, Mak JC, Minette P, Barnes PJ.**

Muscarinic receptor subtypes mediating vasodilation in the pulmonary artery.  
Eur J Pharmacol. 1988;158:293-7.

**McMahon TJ, Hood JS, Kadowitz PJ.**

Pulmonary vasodilator response to vagal stimulation is blocked by N omega-nitro-L-arginine methyl ester in the cat.  
Circ Res. 1992;70:364-9.

**McMahon TJ, Kadowitz PJ.**

Methylene blue inhibits neurogenic cholinergic vasodilator responses in the pulmonary vascular bed of the cat.  
Am J Physiol. 1992;263:L575-84.

**Millar BC, Weis T, Piper HM, Weber M, Borchard U, McDermott BJ, Balasubramaniam A.**

Positive and negative contractile effects of neuropeptide Y on ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol.* 1991;261:H1727-33.

**Minette PA, Barnes PJ.**

Muscarinic receptor subtypes in lung. Clinical implications. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141:S162-5. Review.

**Minkes RK, McMahon TJ, Hood JS, Murphy WA, Coy DH, McNamara DB, Kadowitz PJ.**

Differential effects of PACAP and VIP on the pulmonary and hindquarters vascular beds of the cat. *J Appl Physiol.* 1992;72:1212-7.

**Misu Y, Kaiho M, Ogawa K, Kubo T.**

Adrenergic transmission failure via the blockade of presynaptic beta receptors in guinea-pig pulmonary arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981;218:242-7.

**Modin A, Pernow J, Lundberg JM.**

Evidence for two neuropeptide Y receptors mediating vasoconstriction. *Eur J Pharmacol.* 1991;203:165-71.

**Moffatt JD, Dumsday B, McLean JR.**

Non-adrenergic, non-cholinergic neurons innervating the guinea-pig trachea are located in the oesophagus: evidence from retrograde neuronal tracing. *Neurosci Lett.* 1998;248:37-40.

**Molenaar P, Canale E, Summers RJ.**

Autoradiographic localization of beta-1 and beta-2 adrenoceptors in guinea pig atrium and regions of the conducting system. *J Pharmacol Exp Ther.* 1987;241:1048-64.

**Morrison KJ, Vanhoutte PM.**

Characterization of muscarinic receptors that mediate contraction of guinea-pig isolated trachea to choline esters: effect of removing epithelium. *Br J Pharmacol.* 1992;106:672-6.

**Muramatsu I.**

The effect of reserpine on sympathetic, purinergic neurotransmission in the isolated mesenteric artery of the dog: a pharmacological study. *Br J Pharmacol.* 1987;91:467-74.



**Mutt V, Said SI.**

Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. The amino-acid sequence. Use of kallikrein in its determination.  
Eur J Biochem. 1974;42:581-9.

**Nandiwada PA, Hyman AL, Kadowitz PJ.**

Pulmonary vasodilator responses to vagal stimulation and acetylcholine in the cat.  
Circ Res. 1983;53:86-95.

**Nathan CF, Hibbs JB Jr.**

Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity.  
Curr Opin Immunol. 1991;3:65-70. Review.

**Obara H, Hoshino Y, Mori M, Mikawa K, Iwai S.**

Endothelium-dependent relaxation in isolated pulmonary arteries from rabbits exposed to hyperoxia.  
Crit Care Med. 1989;17:780-5.

**Olmez E, Guc MO, Ilhan M.**

Inhibitory muscarinic cholinceptors on postganglionic sympathetic nerves in the guinea pig isolated atrium are of the M3 subtype.  
Pharmacology. 1995;51:112-7.

**Palmer JB, Cuss FM, Barnes PJ.**

VIP and PHM and their role in nonadrenergic inhibitory responses in isolated human airways.  
J Appl Physiol. 1986;61:1322-8.

**Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S.**

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.  
Nature. 1987;327:524-6.

**Palmer RM, Moncada S.**

A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells.  
Biochem Biophys Res Commun. 1989;158:348-52.

**Pardini BJ, Lund DD, Puk DE.**

Sites at which neuropeptide Y modulates parasympathetic control of heart rate in guinea pigs and rats.  
J Auton Nerv Syst. 1992;38:139-45.

**Patel HJ, Barnes PJ, Takahashi T, Tadjkarimi S, Yacoub MH, Belvisi MG.**

Evidence for prejunctional muscarinic autoreceptors in human and guinea pig trachea.  
Am J Respir Crit Care Med. 1995;152:872-8.

**Peart WS.**

The nature of splenic sympathin.  
J Physiol. 1949;108:491-501.

**Pelletier G, Guy J, Allen YS, Polak JM.**

Electron microscope immunocytochemical localization of neuropeptide Y (NPY) in the rat brain.  
Neuropeptides. 1984;4:319-24.

**Pendry YD, MacLagan J.**

Evidence for prejunctional inhibitory muscarinic receptors on sympathetic nerves innervating guinea-pig trachealis muscle.  
Br J Pharmacol. 1991;103:1165-71.

**Pernow J, Lundberg JM.**

Release and vasoconstrictor effects of neuropeptide Y in relation to non-adrenergic sympathetic control of renal blood flow in the pig.  
Acta Physiol Scand. 1989;136:507-17.

**Pernow J, Saria A, Lundberg JM.**

Mechanisms underlying pre- and postjunctional effects of neuropeptide Y in sympathetic vascular control.  
Acta Physiol Scand. 1986;126:239-49.

**Popma JJ, Smitherman TC, Bedotto JB, Eichhorn EJ, Said SI, Dehmer GJ.**

Direct coronary vasodilation induced by intracoronary vasoactive intestinal peptide.  
J Cardiovasc Pharmacol. 1990;16:1000-6.

**Potter E.**

Presynaptic inhibition of cardiac vagal postganglionic nerves by neuropeptide Y.  
Neurosci Lett. 1987;83:101-6.

**Preuss JM, Goldie RG.**

Muscarinic cholinceptor subtypes mediating tracheal smooth muscle contraction and inositol phosphate generation in guinea pig and rat.  
Eur J Pharmacol. 1999;372:269-77.

**Racke K, Hey C, Wessler I.**

Endogenous noradrenaline release from guinea-pig isolated trachea is inhibited by activation of M2 receptors.  
Br J Pharmacol. 1992;107:3-4.

**Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ.**

Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission.  
N Engl J Med. 1992;326:90-4.

**Richardson JB.**

Nerve supply to the lungs.  
Am Rev Respir Dis. 1979;119:785-802.

**Sada K, Shirai M, Ninomiya I.**

Vagally and acetylcholine-mediated constriction in small pulmonary vessels of rabbits.  
J Appl Physiol. 1987;63:1601-9.

**Saga T, Said SI.**

Vasoactive intestinal peptide relaxes isolated strips of human bronchus, pulmonary artery, and lung parenchyma.  
Trans Assoc Am Physicians. 1984;97:304-10.

**Said SI, Mutt V.**

Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine.  
Science. 1970;169:1217-8.

**Said SI, Mutt V.**

Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut.  
Nature. 1970;225:863-4.

**Schoeffter P, Stoclet JC.**

Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on cyclic AMP level and relaxation in rat isolated aorta.  
Eur J Pharmacol. 1985;109:275-9.

**Schulze W, Fu ML.**

Localization of alpha 1-adrenoceptors in rat and human hearts by immunocytochemistry. *Mol Cell Biochem.* 1996;163-164:159-65.

**Scott JA, Craig I, McCormack DG.**

Nonadrenergic noncholinergic relaxation of human pulmonary arteries is partially mediated by nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:629-32.

**Scott JA, McCormack DG.**

Nonadrenergic noncholinergic vasodilation of guinea pig pulmonary arteries is mediated by nitric oxide. *Can J Physiol Pharmacol.* 1999;77:89-95.

**Sheikh SP, Holst JJ, Skak-Nielsen T, Knigge U, Warberg J, Theodorsson-Norheim E, Hokfelt T, Lundberg JM, Schwartz TW.**

Release of NPY in pig pancreas: dual parasympathetic and sympathetic regulation. *Am J Physiol.* 1988;255:G46-54.

**Shigyo M, Aizawa H, Koto H, Matsumoto K, Takata S, Hara N.**

Pre- and post-junctional effects of VIP-like peptides in guinea pig tracheal smooth muscle. *Respiration.* 1997;64:59-65.

**Smitherman TC, Popma JJ, Said SI, Krejs GJ, Dehmer GJ.**

Coronary hemodynamic effects of intravenous vasoactive intestinal peptide in humans. *Am J Physiol.* 1989;257:H1254-62.

**Smitherman TC, Popma JJ, Said SI, Krejs GJ, Dehmer GJ.**

Coronary hemodynamic effects of intravenous vasoactive intestinal peptide in humans. *Am J Physiol.* 1989;257:H1254-62.

**Sosunov AA, Hassall CJ, Loesch A, Turmaine M, Burnstock G.**

Nitric oxide synthase-containing neurones and nerve fibres within cardiac ganglia of rat and guinea-pig: an electron-microscopic immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 1996;284:19-28.

**Sosunov AA, Hassall CJ, Loesch A, Turmaine M, Burnstock G.**

Ultrastructural investigation of nitric oxide synthase-immunoreactive nerves associated with coronary blood vessels of rat and guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 1995;280:575-82.

**Starke K.**

Presynaptic alpha-autoreceptors.  
Rev Physiol Biochem Pharmacol. 1987;107:73-146. Review.

**Steele PA, Choate JK.**

Innervation of the pacemaker in guinea-pig sinoatrial node.  
J Auton Nerv Syst. 1994;47:177-87.

**Steele PA, Gibbins IL, Morris JL.**

Projections of intrinsic cardiac neurons to different targets in the guinea-pig heart.  
J Auton Nerv Syst. 1996;56:191-200.

**Steele PA, Gibbins IL, Morris JL, Mayer B.**

Multiple populations of neuropeptide-containing intrinsic neurons in the guinea-pig heart.  
Neuroscience. 1994 Sep;62(1):241-50.

**Stjärne L, Lundberg JM, Astrand P.**

Neuropeptide Y--a cotransmitter with noradrenaline and adenosine 5'-triphosphate in the sympathetic nerves of the mouse vas deferens? A biochemical, physiological and electropharmacological study.  
Neuroscience. 1986;18:151-66.

**Strasser RH, Ihl-Vahl R, Marquetant R.**

Molecular biology of adrenergic receptors.  
J Hypertens. 1992 Jun;10(6):501-6. Review.

**Stretton CD, Barnes PJ.**

Modulation of cholinergic neurotransmission in guinea-pig trachea by neuropeptide Y.  
Br J Pharmacol. 1988;93:672-8.

**Stretton CD, Belvisi MG, Barnes PJ.**

Neuropeptide Y modulates non-adrenergic, non-cholinergic neural bronchoconstriction in vivo and in vitro.  
Neuropeptides. 1990;17:163-70.

**Tanaka K, Chiba T.**

Nitric oxide synthase containing nerves in the atrioventricular node of the guinea pig heart.  
J Auton Nerv Syst. 1995;51:245-53.

**Tanaka K, Hassall CJ, Burnstock G.**

Distribution of intracardiac neurones and nerve terminals that contain a marker for nitric oxide, NADPH-diaphorase, in the guinea-pig heart.

Cell Tissue Res. 1993;273:293-300.

**Tanaka K, Ohshima H, Esumi H, Chiba T.**

Direct synaptic contacts of nitric oxide synthase-immunoreactive nerve terminals on the neurons of the intracardiac ganglia of the guinea pig.

Neurosci Lett. 1993;158:67-70.

**Taoudi Benchenkroun M, Fournier A, St-Pierre S, Cadieux A.**

Inhibitory action of neuropeptide Y on agonist-induced responses in isolated guinea pig trachea.

Eur J Pharmacol. 1992;216:421-8.

**Taoudi Benchenkroun M, St-Pierre S, Fournier A, Cadieux A.**

Antagonism of the inhibitory action of neuropeptide Y (NPY) in guinea-pig trachea by the C-terminal fragment NPY (2-36).

Br J Pharmacol. 1993;109:902-4.

**Tatemoto K.**

Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1982;79:5485-9.

**Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V.**

Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide.

Nature. 1982;296:659-60.

**Taton G, Chatelain P, Delhay M, Camus JC, De Neef P, Waelbroeck M, Tatemoto K, Robberecht P, Christophe J.**

Vasoactive intestinal peptide (VIP) and peptide having N-terminal histidine and C-terminal isoleucine amide (PHI) stimulate adenylate cyclase activity in human heart membranes.

Peptides. 1982;3:897-900.

**Tseng CJ, Robertson D, Light RT, Atkinson JR, Robertson RM.**

Neuropeptide Y is a vasoconstrictor of human coronary arteries.

Am J Med Sci. 1988;296:11-6.

**Uddman R, Alumets J, Densert O, Hakanson R, Sundler F.**

Occurrence and distribution of VIP nerves in the nasal mucosa and tracheobronchial wall.

Acta Otolaryngol. 1978;86:443-8.

**Uddman R, Ekblad E, Edvinsson L, Hakanson R, Sundler F.**

Neuropeptide Y-like immunoreactivity in perivascular nerve fibres of the guinea-pig.

Regul Pept. 1985 Mar;10(2-3):243-57.

**Uddman R, Fahrenkrug J, Malm L, Alumets J, Hakanson R, Sundler F.**

Neuronal VIP in salivary glands: distribution and release.  
Acta Physiol Scand. 1980;110:31-8.

**Uddman R, Malm L, Sundler F.**

The origin of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) nerves in the feline nasal mucosa.  
Acta Otolaryngol. 1980;89:152-6.

**Uddman R, Sundler F.**

Innervation of the upper airways.  
Clin Chest Med. 1986;7:201-9. Review.

**Uddman R, Sundler F, Emson P.**

Occurrence and distribution of neuropeptide-Y-immunoreactive nerves in the respiratory tract and middle ear.  
Cell Tissue Res. 1984;237(2):321-7.

**Uvnäs B.**

Sympathetic vasodilator outflow.  
Physiol Rev. 1954, 34, 608-618

**Venugopalan CS, Krautmann MJ, Holmes EP, Maher TJ.**

Involvement of nitric oxide in the mediation of NANC inhibitory neurotransmission of guinea-pig trachea.  
J Auton Pharmacol. 1998;18:281-6.

**Venugopalan CS, Said SI, Drazen JM.**

Effect of vasoactive intestinal peptide on vagally mediated tracheal pouch relaxation.  
Respir Physiol. 1984;56:205-16.

**Von Euler US.**

A specific sympathomimetic ergone in adrenergic nerve fibres (Sympathin) and its relations to adrenaline and noradrenaline.  
Acta Physiol Scand. 1946;12:73-97.

**Von Euler US.**

Identification of the sympathomimetic ergone in adrenergic nerves of cattle (Sympathin N) with laevo-noradrenaline.  
Acta Physiol Scand. 1948;16:63-74.

**Wahlestedt C, Wohlfart B, Hakanson R.**

Effects of neuropeptide Y (NPY) on isolated guinea-pig heart.  
Acta Physiol Scand. 1987;129:459-63.

**Wahlestedt C, Yanaihara N, Hakanson R.**

Evidence for different pre-and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides.  
Regul Pept. 1986;13:307-18.

**Waldman SA, Murad F.**

Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system.  
J Cardiovasc Pharmacol. 1988;12 Suppl 5:S115-8. Review.

**Waldman SA, Murad F.**

Cyclic GMP synthesis and function.  
Pharmacol Rev. 1987;39:163-96. Review.

**Wang J, Irnaten M, Neff RA, Venkatesan P, Evans C, Loewy AD, Mettenleiter TC, Mendelowitz D.**

Synaptic and neurotransmitter activation of cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus.  
Ann N Y Acad Sci. 2001;940:237-46. Review.

**Warland JJ, Burnstock G.**

Effects of reserpine and 6-hydroxydopamine on the adrenergic and purinergic components of sympathetic nerve responses of the rabbit saphenous artery.  
Br J Pharmacol. 1987;92:871-80.

**Weihe E, Reinecke M.**

Peptidergic innervation of the mammalian sinus nodes: vasoactive intestinal polypeptide, neurotensin, substance P.  
Neurosci Lett. 1981;26:283-8.

**Weihe E, Reinecke M, Forssmann WG.**

Distribution of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in the mammalian heart. Interrelation with neurotensin- and substance P-like immunoreactive nerves.  
Cell Tissue Res. 1984;236:527-40.

**Wessendorf MW, Elde RP.**

Characterization of an immunofluorescence technique for the demonstration of coexisting neurotransmitters within nerve fibers and terminals.  
J Histochem Cytochem 1985;33:984-94



**Yang ZJ, Biggs DF.**

Muscarinic receptors and parasympathetic neurotransmission in guinea-pig trachea.  
Eur J Pharmacol. 1991;193:01-8.

**Yoshiyama M, Miura K, Nishikimi T, Teragaki M, Todi I, Akioka K, Takeuchi K, Takeda T.**

Role of nitric oxide in the vasodilatory responses to acetylcholine and bradykinin in perfused hearts.  
Jpn Circ J. 1993;57:1159-63.

**Zhu L, Wang WZ, Jin XH, Zhao RR, Hjalmarson A, Fu ML.**

Immunocytochemical studies of M2 muscarinic receptors in guinea pig atria and ventricles using anti-peptide antibodies.  
Blood Press Suppl. 1996;3:19-21.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. W. Kummer möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und Hilfe während der Planung und Niederschrift dieser Arbeit, sowie für seine Geduld und stets konstruktive Kritik während der praktischen Ausführung danken.

Für die geduldige und freundliche Unterstützung der technischen Durchführung der Arbeit in Gießen möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn M. Bodenbenner, Frau T. Fischbach, Frau A. Goldberg, Frau P. Hartmann, Frau K. Michael, Frau C. Tag und Frau S. Wiegand bedanken.

Herrn M. Unger danke ich für seine technischen Hilfestellungen und seine zahlreichen fachlichen Ratschläge, mit denen er mich im Kampf gegen den Computer unterstützte.

Bei meinen Eltern und meiner Schwester Silke möchte ich mich für die immerwährende liebevolle Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Ein letzter Dank gilt meiner Freundin Zorka und unserer Tochter Lilly für ihre liebevolle Zuwendung, ihre Unterstützung und Ihr Verständnis.